

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ACTIVIDAD**  
**FÍSICA Y EL DEPORTE**



**TESIS DOCTORAL**

**“DETERMINACIÓN DE  $\alpha$ -ACTINA EN DEPORTISTAS DE  
ALTO RENDIMIENTO COMO DETECCIÓN PRECOZ DE  
LIBERACIÓN PROTEICA”**

Memoria presentada por D. Antonio Martínez Amat para optar al grado de  
Doctor Europeo en ciencias de la Actividad Física y el Deporte.

Granada, 29 de Abril de 2005



El trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis:

**“DETERMINACIÓN DE  $\alpha$ -ACTINA EN DEPORTISTAS DE  
ALTO RENDIMIENTO COMO DETECCIÓN PRECOZ DE  
LIBERACIÓN PROTEICA”**

ha sido realizado por el licenciado Don ANTONIO MARTÍNEZ AMAT

durante los años 2002-2005 bajo la dirección de:

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ

D. PAULINO PADIAL PUCHE

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES

Este trabajo ha sido subvencionado por el

Centro Andaluz de Medicina del Deporte (CAMD)

(Expediente 2003/319563)

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis han sido aceptados para su publicación: A. Martínez Amat, H. Boulaiz, J. Prados, J.A. Marchal, P. Padial, O. Caba, F. Rodríguez-Serrano, A. Aránega. : Release of  $\alpha$ -actin into serum after skeletal muscle damage. Br. J. Sports Med. (in press 2005)

**Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.**

**HACE CONSTAR:**

Que D° Antonio Martínez Amat ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Determinación de a-actina en deportistas de alto rendimiento como detección precoz de liberación proteica”** durante los años 2002-2005, y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 29 de Abril de 2005.

Fdo. Antonia Aránega Jiménez

**D. PAULINO PADIAL PUCHE** PROFESOR TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN FÍSICA Y DEPORTIVA DE LA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**HACE CONSTAR:**

Que D Antonio Martínez Amat ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Determinación de  $\alpha$ -actina en deportistas de alto rendimiento como detección precoz de liberación proteica”** durante los años 2002-2005, y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 29 de Abril de 2005.

Fdo. Paulino Padial Puche

**D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES**, PROFESOR TITULAR  
DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD  
DE JAEN.

**HACE CONSTAR:**

Que D Antonio Martínez Amat ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Determinación de  $\alpha$ -actina en deportistas de alto rendimiento como detección precoz de liberación proteica”** durante los años 2002-2005, y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 29 de Abril de 2005.

Fdo. Juan Antonio Marchal Corrales

*A mis padres, a mi hermana y amigos  
como muestra de mi agradecimiento por el  
estímulo y ayuda recibidos a lo largo de mi vida,  
y porque a ellos les debo  
todo lo que soy.*

**Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:**

A la Prof. Dña. *Antonia Aránega Jiménez*, que sugirió el tema de esta investigación y lo ha dirigido con permanente dedicación. Agradeciéndole que me haya permitido realizar esta tesis bajo su dirección, poniendo a mi disposición todo lo necesario para su realización, lo que me ha permitido introducirme en el apasionante campo de la investigación. Le quiero agradecer también su apoyo desinteresado, su dedicación constante y la confianza depositada en mí.

Al Prof. D. *Luis Álvarez Guisado*, cuyo ejemplo de constancia en el trabajo y de entusiasmo me ha servido como estímulos para la realización de esta tesis.

Al Prof. D. *Juan Antonio Marchal*, por su continua supervisión del trabajo, mostrándome su apoyo en los peores momentos; por su optimismo, y por el día a día.

Al Prof. D. *Paulino Padial*, que sin sus orientaciones y continuo apoyo desde el inicio de mi periodo de investigación, no hubiera sido posible la realización y confección de esta tesis doctoral.

A mis compañeros de batalla, *Fernando Rodríguez y Octavio Caba*, por su paciencia y ayuda, por los buenos momentos y los malos. Y sin su apoyo no hubiera sido posible recorrer este camino que iniciamos juntos.

A las Profs. Dña. *Esmeralda Carrillo Delgado* y Dña. *Houria Boulaiz*, por su estímulo, ayuda y animo constante y sobre todo por la orientación y continuo apoyo desde el inicio del periodo de la formación investigadora.

Al Prof. D. *Jose Carlos Prados Salazar*, por el apoyo, colaboración en la realización de la tesis y la amistad que siempre me ha ofrecido.

Al Prof. D. *Ignacio Martín*, por su inestimable ayuda en la realización del estudio estadístico de esta tesis, gracias por tu profesionalidad en el trabajo realizado.

A todo el grupo de investigación, “Nuevas Tecnologías Aplicadas a la Investigación en Biomedicina”, por su gran acogida recibida y por su apoyo continuo y desinteresado.

A todo el personal de los Departamentos de Ciencias Morfológicas y de Educación Física y Deportiva, por su ayuda y en particular quiero agradecer a los Profs. Ignacio Chiroso y Luis Javier Chiroso por su participación en parte de los experimentos que componen esta tesis.

Al Prof. y amigo *Jesús Cañadillas*, por su apoyo y la amistad que siempre me ha ofrecido.

A todos mis amigos, que han estado a mi lado apoyándome constantemente.

Por último a todas aquellas personas que sin aparecer aquí reflejadas han contribuido de alguna forma a la realización de esta Tesis doctoral.

A todos gracias

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. ANATOMÍA FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....</b>	<b>4</b>
1.1. ANATOMÍA DEL MÚSCULO.....	4
1.1.1. Elemento contráctil de la célula muscular: la miofibrilla.....	6
1.1.2. Miofilamentos: filamentos gruesos y delgados.....	7
1.1.3. Retículo sarcoplásmico y túbulos t (túbulos transversos).....	11
1.1.4. Puentes cruzados en reposo.....	11
1.1.5. Puentes cruzados en trabajo.....	12
1.2. FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS.....	13
1.2.1. Fibras musculares de contracción lenta y de contracción rápida.....	14
1.2.2. Tipos de fibras y ejercicio físico.....	15
<b>2. MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.....</b>	<b>17</b>
2.1. ESTIMULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR: PAPEL DEL CALCIO...20	
2.2. EFICACIA DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.....	21
2.3. TIPOS DE CONTRACCIÓN MUSCULAR.....	22
<b>3. DAÑO MUSCULAR.....</b>	<b>25</b>
3.1. CARACTERÍSTICAS DEL DAÑO MUSCULAR INDUCIDO POR EL EJERCICIO.....	26
3.2. REACCIÓN INFLAMATORIA PRECOZ.....	28
3.3. LAS CÉLULAS SATÉLITE.....	30
3.4. EL ORIGEN METABÓLICO DE LAS LESIONES MUSCULARE.....	31
3.5. RELACIÓN ENTRE LESIONES MUSCULARES Y SOBREENTRENAMIENTO.....	33
3.5.1. Modificaciones bioquímicas producidas por el sobreentrenamiento.....	36
<b>4. MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR.....</b>	<b>39</b>

4.1. GENERALIDADES.....	39
4.2. MARCADORES CLÁSICOS.....	40
4.2.1. Creatina-quinasa (CK).....	42
4.2.2. Láctico deshidrogenasa (LDH).....	47
4.3. EVOLUCIÓN DE LOS DISTINTOS MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR.....	50
4.4. NUEVOS MARCADORES.....	51
4.4.1. Troponinas.....	51
4.4.2. Cadenas de miosina.....	56
4.4.3. Mioglobina.....	57
<b>5. IMPORTANCIA DE LA ACTINA EN LA FIBRA MUSCULAR.....</b>	<b>57</b>
5.1. GENERALIDADES.....	57
5.2. POLIMERACIÓN.....	58
5.3. ESTRUCTURA.....	60
5.4. ISOFORMAS.....	62
5.5. UTILIZACIÓN DE LA ALFA ACTINA EN DAÑO MUSCULAR CARDIACO.....	64
<b>II. HIPÓTESIS.....</b>	<b>67</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>70</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
<b>1. GRUPOS DE PACIENTES.....</b>	<b>74</b>
1.1. GRUPO A, SUJETOS NO DEPORTISTAS CON DAÑO MUSCULAR ESQUELÉTICO.....	74
1.2. GRUPO B, SUJETOS SANOS NO DEPORTISTAS.....	76
1.3. GRUPO C, SUJETOS DEPORTISTAS DE ÉLITE.....	77
1.3.1. Subgrupos.....	78

1.4. GRUPO D, SUJETOS DEPORTISTAS CON DAÑO MUSCULAR ESQUELÉTICO.....	80
<b>2. EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS.....</b>	<b>81</b>
2.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS A 2 SUBGRUPOS EN DIFERENTES SITUACIONES Y ESTUDIOS REALIZADOS.....	81
2.1.1. Extracción de las muestras en un partido de alta competición.....	81
2.1.2. Extracción de las muestras en un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante.....	81
<b>3. PROCESAMIENTO ANALÍTICO.....</b>	<b>82</b>
3.1. PROTEINAS TOTALES.....	82
3.2. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS.....	82
3.3. ACTIVIDAD TOTAL DE LA CREATIN KINASA.....	83
3.4. ISOENZIMAS DE CREATIN KINASA (CKMM Y CKMB).....	83
3.5. MIOGLOBINA.....	86
3.6. TROPONINA I -CARDIO ESPECÍFICA, cTnI.....	86
3.7. TROPONINA T- MUSCULO ESQUELÉTICA, cTnT.....	87
3.8. ALFA-ACTINA.....	88
<b>4. TEST DE ESFUERZO.....</b>	<b>101</b>
<b>5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>103</b>
5.1. ESTUDIO 1.....	103
5.2. ESTUDIO 2.....	105
5.3. ESTUDIO 3.....	107
5.4. ESTUDIO 4.....	109
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>113</b>
<b>1. ESTUDIO 1: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS DIFERENTES VARIABLES             EN LOS CUATRO GRUPOS DE ESTUDIO.....</b>	<b>114</b>
1.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE MIOGLOBINA.....	114
1.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN CREATINA FOSFOQUINASA.....	116

1.3. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LDH.....	119
1.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE Tnl.....	121
1.5. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnT.....	124
1.6. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA-ACTINA.....	126
1.7. RESUMEN DE LOS NIVELES DE LAS VARIABLES DENTRO DE CADA GRUPO.....	130
1.8. ANÁLISIS INFERENCIAL DEL ESTUDIO 1.....	130
<b>2. ESTUDIO 2: ANÁLISIS ESTADISTICO DE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS (SUB 1, SUB 2 Y SUB 3).....</b>	<b>135</b>
2.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE MIOGLOBINA.....	136
2.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE CREATINA FOSFOQUINASA.....	138
2.3. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LDH.....	140
2.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE Tnl.....	143
2.5. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnT.....	145
2.6. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA-ACTINA.....	148
2.7. RESUMEN DE LOS NIVELES DE LAS VARIABLES DENTRO DE CADA GRUPO.....	151
2.8. ANALISIS INFERENCIAL DEL SEGUNDO ESTUDIO.....	152
<b>3. ESTUDIO 3: ANÁLISIS ESTADISTICO DE LOS SUBGRUPOS 1 Y 2 (BALONMANO Y RUGBY) ANTES Y DESPUÉS DE UN PARTIDO DE ALTA COMPETICIÓN.....</b>	<b>154</b>
3.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE MIOGLOBINA.....	154
3.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE CREATINA FOSFOQUINASA.....	156
3.3. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LDH.....	158
3.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE Tnl.....	159

3.5. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnT.....	161
3.6. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA-ACTINA.....	163
3.7. ANALISIS INFERENCIAL DEL TERCER ESTUDIO.....	165
<b>4. ESTUDIO 4: ANÁLISIS ESTADISTICO DEL GRUPO DE JUGADORES DE BALONMANO (SUBGRUPO 1), TRAS LA REALIZACIÓN DE UN TEST DE ESFUERZO MÁXIMO.....</b>	<b>166</b>
4.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE MIOGLOBINA.....	167
4.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE CREATINA FOSFOQUINASA.....	168
4.3. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LDH.....	170
4.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE Tnl.....	171
4.5. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnT.....	173
4.6. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA ACTINA.....	175
4.7. RESUMEN DE LOS NIVELES DE LAS VARIABLES DENTRO DE CADA GRUPO.....	177
4.8. ANALISIS INFERENCIAL DEL CUARTO ESTUDIO.....	177
<b>5. APÉNDICE.....</b>	<b>181</b>
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>191</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>215</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>217</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**

Que el ejercicio físico intenso o moderado, sobretodo el excéntrico provoca daño muscular es un hecho universalmente aceptado. Los estudios realizados hasta el momento sugieren que los efectos inmediatos asociados a la lesión muscular son de tipo mecánico, y se originan fundamentalmente por la tensión soportada por el sarcómero de la fibra muscular. Experimentos de tipo mecánico han demostrado como una excesiva tensión en el sarcómero es la causa primaria de la lesión muscular (Lieber *et al.*, 1999). Estos mismos autores postulan que esta excesiva tensión provoca una disrupción intra y/o extracelular de las membranas que permite la hidrólisis de proteínas estructurales, provocando a su vez la desestructuración miofibrilar que se observa habitualmente. Posteriormente aparece el fenómeno de la inflamación, la cual ayuda a degradar y reparar el tejido. La prevención de la inflamación conlleva una pérdida de la función muscular más duradera.

El daño muscular asociado al ejercicio físico ha sido estudiado tanto desde el campo bioquímico como desde el campo histológico, viéndose que dicho daño ocurre tanto en animales como en humanos. Este daño va ligado a una alteración de las propiedades contráctiles musculares, con la correspondiente pérdida de fuerza máxima voluntaria (Balnave *et al.*, 1993; Nosaka *et al.*, 1991).

Con el desarrollo de la biología molecular dentro del terreno de la actividad física y en particular con el desarrollo de la biotecnología en el ámbito del rendimiento deportivo se ha contribuido muy notablemente al avance en el campo de los marcadores de daño músculo esquelético, siendo este hasta el momento un terreno muy virgen en la aplicación de dichas técnicas bio-moleculares. El impulso tecnológico y conceptual que ha representado los anticuerpos monoclonales ha aportado una poderosa y valiosísima herramienta diagnóstica.

En la actualidad son los inmunoensayos los métodos más usados para la identificación y cuantificación de moléculas en química clínica. Aportan una gran sensibilidad al mismo tiempo que una gran especificidad. A pesar de algunas controversias, se considera que la detección, incluso en pequeñas

cantidades, de proteínas ligadas a estructuras intracelulares (mitocondrias, núcleo, complejo contráctil celular) es siempre indicativa de necrosis (Santaló *et al.*, 2003).

Diversos marcadores han sido propuestos para determinar el daño muscular, pero todos los parámetros disponibles actualmente tienen limitaciones. La liberación de enzimas musculares no refleja claramente el daño estructural del músculo como se ha estimado por análisis histológico. Hoy en día en el terreno deportivo, las técnicas utilizadas, como la determinación de creatinquinasa y lactodeshidrogenasa, presentan graves problemas de rapidez y fiabilidad en el diagnóstico y detección de las proteínas contráctiles (Clarkson *et al.*, 1986; Prou *et al.*, 1996). La actividad enzimática de CK en suero o la concentración de MDA en plasma pueden no aumentar durante el sobreentrenamiento y cambios en estos parámetros bioquímicos pueden reflejar solo una sobrecarga muscular (Komulainen *et al.*, 1995). Sin embargo, después de ejercicio prolongado, las citoquinas se producen localmente en el músculo esquelético.

La producción de citoquinas pro-inflamatorias puede contribuir a una disminución en la función inmune y a una susceptibilidad creciente a infecciones específicas. La alteración de las defensas inmunitarias que resulta de la producción de estas citoquinas entra dentro de los cuadros clínicos del sobreentrenamiento.

Frente a ello, esta la alternativa de utilizar técnicas de biología molecular que detectan especialmente las moléculas de actina (Aránega *et al.*, 1999; Velez *et al.*, 2000) y miosina directamente, ya que estas proteínas están estrechamente relacionadas con la contracción muscular (Korn *et al.*, 1982). Es necesario pues, utilizar una tecnología de alta sensibilidad y fiabilidad (Creagh *et al.*, 1998) capaz de detectar proteínas indicadoras de sufrimiento muscular en un tiempo reducido y con alta seguridad, especialmente en los casos de dudas diagnósticas mediante la clínica y la analítica correspondiente. Dicha tecnología debe permitir la optimización de los recursos y a una reducción

significativa de los efectos negativos de la inactividad deportiva, así como el aumento del rendimiento controlado. En el caso del entrenamiento deportivo disponer de un marcador útil para establecer los umbrales del esfuerzo en dicho entrenamiento.

El detectar proteínas tanto cuantitativa como cualitativamente, puede ser de una gran relevancia en el campo del entrenamiento de deportistas altamente cualificados para una disciplina específica (Booth *et al.*, 2002), donde el ajuste máximo de los programas de entrenamiento es vital para la consecución de las marcas, y para la realización de programas de rehabilitación (Jin *et al.*, 2000).

## **1. ANATOMÍA FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.**

Alrededor del 40% del organismo está constituido por músculo esquelético, y quizá otro 10% corresponde a músculo liso y músculo cardiaco (Epstein *et al.*, 1998). Muchos de los mismos principios de contracción se aplican a todos estos diferentes tipos de músculos, pero en este punto se considerará principalmente la función del músculo esquelético.

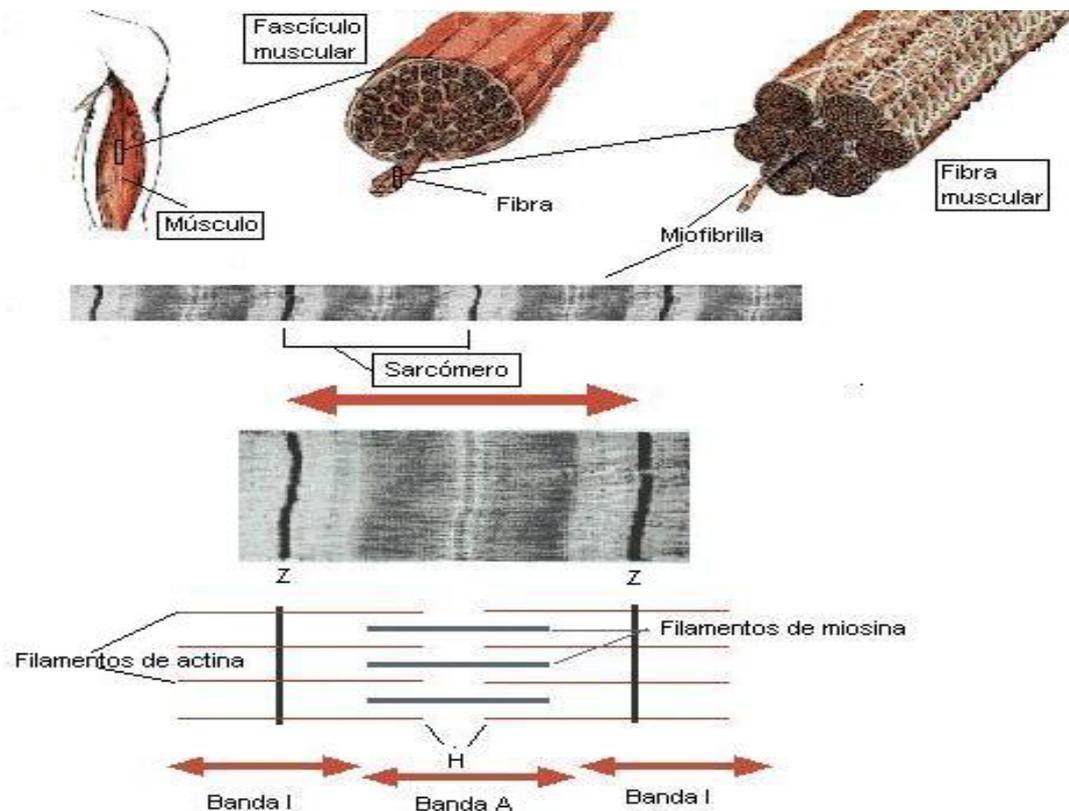
### **1.1. ANATOMÍA DEL MÚSCULO**

Existen dos grandes categorías fundamentales de tejido muscular: el músculo liso y el estriado. El músculo liso está compuesto por células fusiformes, de un solo núcleo. Se contrae en respuesta a la estimulación del sistema nervioso autónomo, y por ello, no está sometido a un control voluntario.

El músculo estriado aparece asociado con el esqueleto y es el responsable del movimiento locomotor y de otros movimientos voluntarios. Está innervado por el sistema nervioso cerebroespinal. Está constituido por unidades cilíndricas muy largas, fibras musculares, que son sincicios multinucleados que contienen un gran número de filamentos citoplásmicos densamente apretados y con una disposición altamente ordenada (Gordon *et al.*, 2000).

El músculo estriado es el tipo que asociamos con más frecuencia al término músculo, ya que son los músculos estriados de los brazos, las piernas, los párpados, etc, los que hacen posible los movimientos voluntarios. El músculo liso rodea los órganos internos como los vasos sanguíneos, el intestino y la vesícula biliar, que son capaces de realizar unas contracciones lentas y mantenidas, que no están bajo un control voluntario. El músculo cardíaco puede considerarse una forma especializada de músculo estriado, adaptado para realizar los latidos involuntarios repetidos del corazón (Rayment *et al.*, 1994).

En la siguiente Figura 1 se muestran los niveles sucesivos de organización de un músculo estriado característico de un vertebrado. Las fibras musculares individuales, son en realidad células multinucleadas muy largas (1-40 nm) formadas por la fusión de células precursoras musculares.



**FIGURA 1. CONFORMACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DESDE EL NIVEL MICROSCÓPICO AL MOLECULAR**

### **1.1.1. Elemento contráctil de la célula muscular: la miofibrilla.**

La fibra muscular es una célula alargada, con aspecto estriado y múltiples núcleos, donde la mayor parte del citoplasma (unas dos terceras partes de su masa seca) está ocupada por una estructura que representa una especialización de este tipo de células: las miofibrillas.

Las miofibrillas son elementos cilíndricos de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro dispuestas paralelamente al eje principal de la célula que se extiende a lo largo de la fibra muscular, y presenta prominentes bandas seriadas, responsables de la apariencia estriada de la célula muscular. Estos son los verdaderos elementos contráctiles de la misma, como lo demuestra su capacidad de contraerse aisladamente fuera de la célula cuando se les añade  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP (Alberts *et al.*, 1989).

Cada miofibrilla está formada a su vez por una cadena de diminutas unidades contráctiles, compuestas por ensamblajes repetidos de proteínas citoesqueléticas. Estas unidades estructurales se denominan sarcómeros, de 2.5  $\mu\text{m}$  de longitud, que se repiten regularmente, y son fácilmente visibles a microscopio óptico. Los sarcómeros de las miofibrillas adyacentes están alineados, dando a la célula un aspecto estriado y característico (Forbes *et al.*, 1984).

Así, la miofibrilla, muestra segmentos fuertemente refringentes y oscuros en el músculo fresco e intensamente teñidos con hematoxilina férrica que se alternan con otros menos refringentes que permanecen prácticamente sin teñir. Al observar el músculo con el microscopio de luz polarizada se invierte el contraste de las bandas. Las bandas que se tiñen fuertemente son ahora birrefringentes o anisótropas (Bandas A), mientras que las bandas que se tiñen ligeramente son isotrópicas (Bandas I). La longitud de la banda A permanece constante en todas las fases de la contracción, no así la banda I que es más larga con el músculo estirado y mucho más corta cuando este está contraído (Gordon *et al.*, 2000).

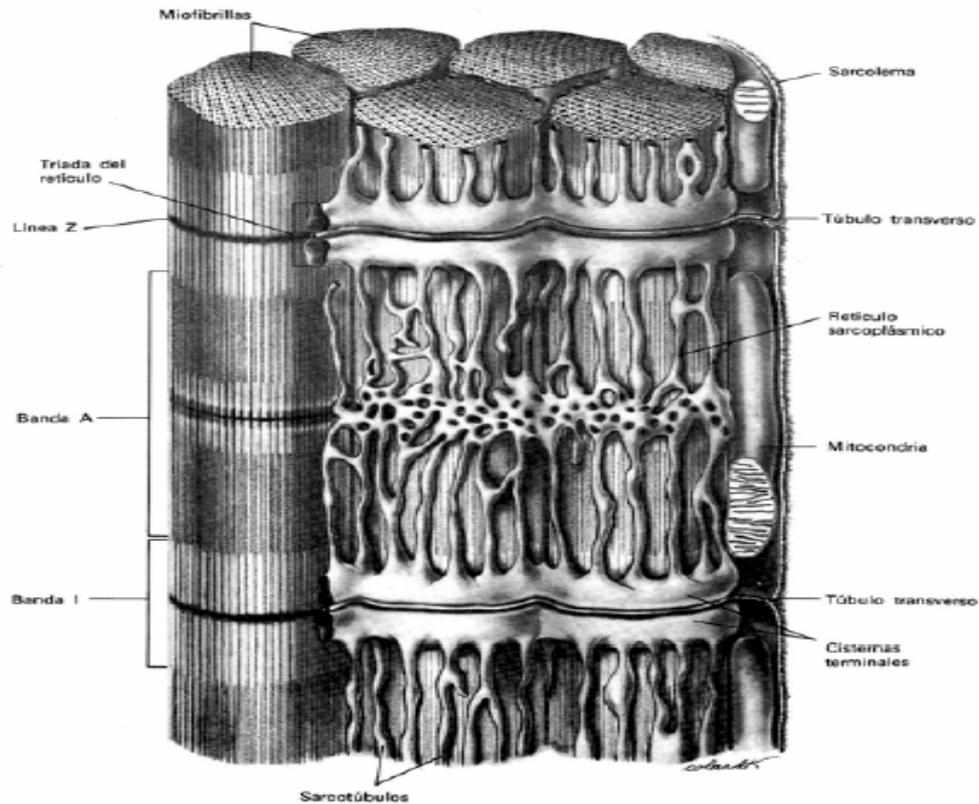


FIGURA 2 .REPRESENTACIÓN DE UNA SARCÓMERA.

Se describe una línea transversal más oscura que divide la banda I por la mitad y que se conoce como Línea Z (Figura 2). En preparaciones histológicas mucho más finas puede verse una zona más pálida la llamada banda H, atravesando la banda A. En su interior, hay localizada una línea oscura estrecha, la banda M o línea M, localizada precisamente en el medio de la banda A (De Robertis *et al.*, 1987) (Figura 2).

Así pues, cada sarcómero está comprendido entre dos líneas Z adyacentes (Offer, 1974) y contiene todos los componentes contráctiles de la miofibrilla.

### 1.1.2. Miofilamentos: filamentos gruesos y delgados.

Al microscopio electrónico, se observa que las miofibrillas están constituidas por filamentos longitudinales de dos tipos diferentes: los *miofilamentos*.

Estos grupos de filamentos proteicos paralelos y parcialmente superpuestos, son los filamentos delgados y los filamentos gruesos (Warber *et al.*, 1986). Los filamentos delgados tienen una longitud aproximada de  $1.0\ \mu\text{m}$  y un diámetro de  $8\ \text{nm}$  (Malhotra *et al.*, 1981) y se extienden desde la línea Z de la banda I hasta la banda A donde penetran, sin llegar a alcanzar la zona H. Los filamentos gruesos tienen una longitud de  $1.6\ \mu\text{m}$  y un diámetro de  $15\ \text{nm}$  y ocupan la banda A se superponen ambos tipos de filamentos, en la banda I sólo se encuentran los filamentos delgados y en la zona H de la banda A sólo existen filamentos gruesos.

En la banda A se observan puentes que se extienden desde los filamentos gruesos hacia los filamentos delgados y que corresponden a las cabezas de las moléculas de miosina. A nivel de la línea M cada filamento grueso se asocia a 6 filamentos gruesos adyacentes, a través de puentes proteicos dispuestos radialmente (Carroll *et al.*, 2004).

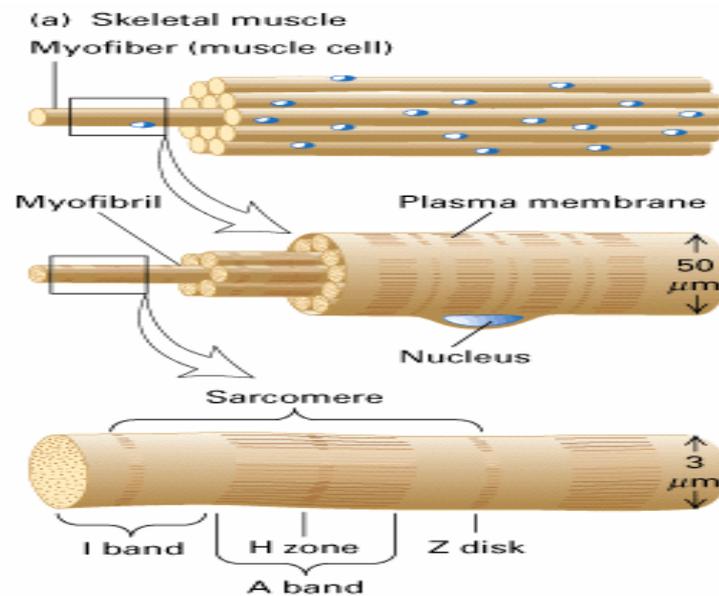


FIGURA 3 .REPRESENTACIÓN DE LAS FIBRAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

La molécula de miosina-II está formada por 2 polipéptidos de  $220\ \text{kD}$  cada uno (cadenas pesadas o meromiosina pesada) y 4 polipéptidos de  $20\ \text{kD}$  cada uno (cadenas ligeras o meromiosina ligera). Está organizada en 3 dominios estructural y funcionalmente distintos: cabeza, cuello y cola. En el extremo NH<sub>2</sub>-terminal las 2 cadenas pesadas presentan una estructura

globular, llamada cabeza, la que se continúa en una zona con forma de bastón, de unos 150 nm de largo, cuya porción inicial corresponde al cuello de la molécula y el resto a la cola (Baumann *et al.*, 2004) (Figura 3).

En el músculo estriado, cada filamento grueso es una estructura bipolar formada por la asociación antiparalela de alrededor de 300 moléculas de miosina-II. La región central del filamento grueso está compuesta de un conjunto de colas dispuestas en forma solapada y antiparalela. Los filamentos gruesos son simétricos a nivel de la región central desnuda y su polaridad se revierte a ambos lados de esta zona. Las cabezas protruyen del filamento en un ordenamiento helicoidal a intervalos de 14 nm. Los filamentos finos a que se enfrenta cada extremo del filamento grueso están también polarizados.

En la molécula de miosina existen dos sitios que pueden experimentar cambios conformacionales: uno a nivel de la unión de la cabeza con la cola y otro a nivel del sitio en que el inicio de la cola se une al cuello de otras moléculas de miosina (Baumann *et al.*, 2004). Estas modificaciones se relacionan con las interacciones que establece la molécula de miosina con ATP y/o G-Actina. Las cabezas de la molécula forman los puentes transversales del filamento de miosina y son el asiento de la actividad ATPásica de la miosina y el lugar de enlace con el ATP. Los filamentos delgados están formados por Actina, Tropomiosina y Troponinas, proteínas que se relacionan directamente con el proceso de acortamiento del sarcómero (Figura 4).

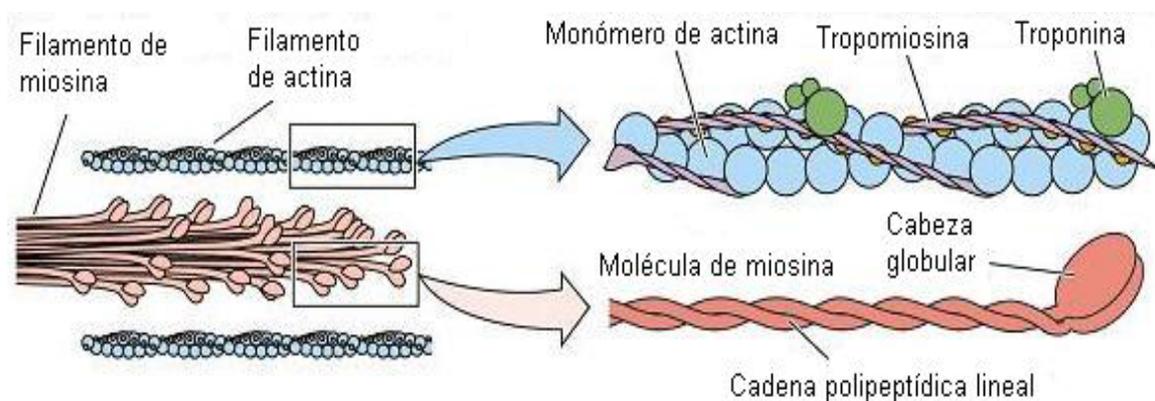


FIGURA 4. IMAGEN DE LOS FILAMENTOS.

Los microfilamentos de Actina filamentosa (Actina F) están constituidos por 2 hebras proteicas, que se enrollan para formar una estructura helicoidal doble cuyas cadenas se cruzan cada 36 a 37 nm. Por cada vuelta hay 13 a 14 monómeros globulares de Actina (Grazi *et al.*, 2004) (Figura 4). Es la proteína más abundante, representa un 25% de total de la miofibrilla. Su peso molecular es de 42 Kd. Cada hebra corresponde a un polímero de moléculas asimétricas de G Actina, lo que otorga a los microfilamentos de Actina una polaridad definida.

La Tropomiosina representa el 5-10% del total. Es una molécula con forma de bastón, de alrededor de 40 nm de longitud, que corresponde a un dímero de 2 cadenas- alfa hélice idénticas, que se enrollan una respecto de la otra para formar filamentos que corren a lo largo de ambos bordes del microfilamento de F-Actina (Grazi *et al.*, 2004) (Figura 4).

La Troponina es un complejo de 3 subunidades que se dispone en forma discontinua a lo largo del microfilamento. El complejo está formado por TnT, que se une fuertemente a la Tropomiosina, TnC que une iones calcio y TnI que se une a Actina. En los filamentos finos, cada molécula de Tropomiosina recorre 7 moléculas de G-Actina y tiene un complejo de Troponina unido a su superficie (Figura 5).

Los filamentos delgados de sarcómeros vecinos anclan en la línea Z a través de las proteínas alfa-actina y Cap Z, que se unen selectivamente al extremo (+) de los filamentos de Actina. Otras proteínas estructurales son la p alfa actinina, la proteína de 85 K, la proteína C, proteínas de la línea M, conectina o titina, etc.

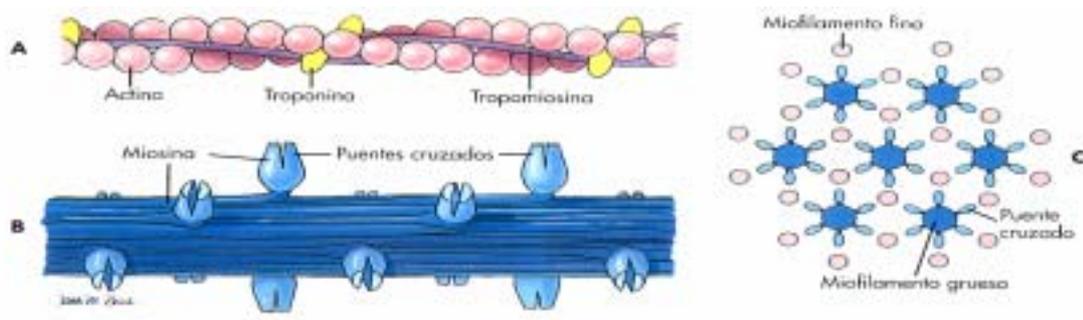


FIGURA 5. ESQUEMA DE LA ORGANIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MIOFILAMENTOS.

### **1.1.3. Retículo sarcoplásmico y túbulos T (túbulos transversos)**

En el músculo esquelético, cada miofibrilla está rodeada de un elaborado sistema de membranas lisas que corresponden al retículo sarcoplásmico. Estas membranas están alineadas en forma precisa con respecto al patrón de bandeo de las miofibrillas. En la zona de unión de la banda A con la banda I el retículo sarcoplásmico se expande para formar las cisternas terminales. Las 2 cisternas terminales paralelas se asocian estrechamente a un tubo transverso (T), formando un complejo denominado tríada.

El sistema de tubos T, está formado por numerosos túbulos continuos con la membrana plasmática (sarcolema) de la célula muscular. Cada uno de estos túbulos corre transversalmente entre 2 cisternas terminales. Aunque las cisternas terminales y el túbulo T están físicamente separados, el espacio entre ellos aparece ocupado regularmente por estructuras que se asocian estrechamente a la membrana de ambos sistemas. La contracción de una fibra muscular requiere de la contracción simultánea de todas sus miofibrillas. La forma y distribución del sistema T permite que la onda de despolarización, responsable de la contracción muscular, se distribuya rápidamente desde la superficie celular hacia el interior del citoplasma alcanzando a cada miofibrilla.

La despolarización de la membrana plasmática de la célula muscular, que se propaga a lo largo de los túbulos T, produce la apertura de canales de  $Ca^{++}$  en la membrana del retículo sarcoplásmico y la liberación de  $Ca^{++}$  hacia el citosol. Se piensa que la onda de despolarización induce un cambio conformacional en proteínas sensoras del túbulo T, que se transmite directamente a la proteína que forma los canales de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico.

### **1.1.4 Puentes cruzados en reposo.**

En reposo, los miofilamentos están distendidos, el proceso cíclico de generación de fuerza se encuentra desactivado. A relativamente bajas concentraciones de calcio se desencadena la reacción de interacciones entre la

Actina y la miosina mediada por el complejo Troponina y Tropomiosina. Estudios de difracción de rayos x y su reconstrucción tridimensional permiten sostener la idea de que la interacción entre Actina y miosina se encuentra bloqueada por la posición de la Tropomiosina. Es evidente que el modelo del bloqueo conformacional es fácil de comprender y didácticamente útil para explicar el estado de contracción pero debe ser reconsiderado. El bloqueo estérico implica que no hay interacciones en estado relajado, sin embargo, hay evidencias de que una parte sustancial de los puentes cruzados permanecen unidos débilmente entre los filamentos delgados (Solaro *et al.*, 1996). Importantes evidencias indican que el ciclo de la ATPasa ocurre sin disociación de las interacciones con la Actina y la débil unión no generadora de fuerza.

#### **1.1.5. Puentes cruzados en trabajo.**

El mecanismo por el cual el músculo estriado desarrolla fuerza y se acorta está basado en la idea de que las cabezas de miosina (los puentes o miosina S1) sobresalen del filamento grueso para reaccionar con los filamentos delgados en una reacción cíclica impulsada por ATP (Hibberd *et al.*, 1986; Irving *et al.*, 1997). La superficie de unión de la región aminoterminal de la miosina se extiende a lo largo de dos Actinas incluyendo tanto el extremo amino como carboxiterminal de la Actina. Un paso en el ciclo consiste en que un nucleótido libre establece un puente firme con la Actina permitiendo ampliar el número de contactos entre miosina y los filamentos delgados. Esta interacción se produce por la combinación de interacciones complementarias, hidrofóbicas e iónicas así como por puentes de hidrógeno.

La unión del nucleótido inicia sustanciales cambios en la relación entre Actina y miosina, resultando la disociación y eventual generación de fuerza impulsada por la hidrólisis de ATP. Los contactos electrostáticos entre las cargas positivas del extremo amino de las cadenas ligeras de la miosina y los residuos cargados negativamente del extremo carboxilo de la Actina forman una región secundaria de contactos entre los puentes cruzados y los filamentos delgados. Aunque la función fisiológica de las cadenas ligeras de la Actina no está aclarada, hay fuertes evidencias de que la interacción puede modular de

forma significativa el ritmo de los ciclos (Morano *et al.*, 1995) y el nivel de potencia de las interacciones de los filamentos delgados.

La activación de la interacción entre la Actina y la miosina conlleva el movimiento y rotación de la Tropomiosina sobre los filamentos delgados y un cambio en la estructura de la Actina (Squire *et al.*, 1993; Lorenz *et al.*, 1995). La dinámica y a la vez extensa interacción entre la Tropomiosina y los filamentos delgados requiere de interacciones muy flexibles entre las proteínas.

La Tropomiosina es una proteína de estructura alfa-hélice formada por un dímero de dos hebras asociadas enfrentando las caras que contienen las cadenas hidrofóbicas que se enredan unas sobre las otras. La Tropomiosina se dispone sobre la Actina en una proporción de una Tropomiosina por cada siete monómeros de Actina. La disposición envolvente de la Tropomiosina a lo largo de la cadena de Actina deja al descubierto, a lo largo de su recorrido, distintas áreas o zonas de la Actina.

## 1.2. FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Se distinguen 3 tipos de fibras musculares esqueléticas: rojas, blancas e intermedias.

Las fibras rojas, que abundan en los músculos rojos, son de diámetro pequeño y contienen gran cantidad de Mioglobina y numerosas mitocondrias, que se disponen en filas entre las miofibrillas y en acúmulos por debajo del sarcolema. Los músculos rojos se contraen más lentamente, por lo que se ha asumido que la fibra roja es una fibra lenta por su menor velocidad de conducción del impulso nervioso (50 – 80 m/seg) (Carroll *et al.*, 2004).

Las fibras blancas, presentes en los músculos blancos, son de diámetro mayor, poseen menor cantidad de Mioglobina y un número menor de mitocondrias que se disponen, de preferencia, entre las miofibrillas, a nivel de la banda I. En este tipo de fibras la línea Z es más delgada que en las fibras

rojas. Las fibras blancas o rápidas son menos excitables pero tienen una mayor velocidad de conducción del impulso nervioso (70 – 110 m/seg).

Las fibras intermedias presentan características intermedias entre las otras 2 variedades de fibras, pero superficialmente se asemejan más a las fibras rojas y son más abundantes en los músculos rojos. Poseen un número de mitocondrias equivalente al de las fibras rojas, pero su línea Z es delgada como en las fibras blancas corren paralelos a los filamentos gruesos, terminando a nivel de la banda H que contiene sólo filamentos gruesos.

### **1.2.1. Fibras musculares de contracción lenta y de contracción rápida:**

No todas las fibras musculares son iguales. Un mismo músculo esquelético contiene dos tipos principales de fibras: de contracción lenta (ST, del inglés show-twitch) y de contracción rápida (FT, del inglés fase-twitch). La mayoría de las clasificaciones (como la realizada anteriormente) se refieren a estos extremos como fibras del Tipo I rojas de contracción lenta (ST) y fibras del tipo II blancas, de contracción rápida (FT), donde la diferencia en el color se debe al hecho de que las fibras rojas tienen un contenido más elevado de mioglobina.

Las fibras de contracción lenta necesitan aproximadamente 110 ms para alcanzar su máxima tensión cuando son estimuladas. Las fibras de contracción rápida, por otro lado, pueden alcanzar su máxima tensión en unos 50 ms (Brooke *et al.*, 1970).

Aunque sólo se ha identificado un tipo de fibra ST, las fibras FT pueden clasificarse con mayor detalle. Los dos tipos de fibras FT son las de contracción rápida de tipo a (FTa) y las de contracción rápida de tipo b (FTb). Se han identificado un tercer subtipo de fibras de contracción rápida: las de tipo c (FTc).

Las diferencias más significativas entre las fibras FTa, FTb y FTc no se entiende del todo, pero se cree que las fibras FTa son las que se movilizan con

más frecuencia. Únicamente las fibras ST se movilizan con mayor frecuencia que las fibras FTa. Las fibras FTc son las que se usan con menor frecuencia. Por término medio, la mayoría de los músculos están compuestos por aproximadamente un 50 % de fibras ST y un 25 % de fibras FTa. El restante 25 % son principalmente fibras FTb, formando las fibras FTc solamente del 1% al 3 % del músculo. Puesto que los conocimientos sobre ellas son limitados, no vamos a seguir sobre las fibras FTc. El porcentaje exacto de este tipo de fibras en diversos músculos varía enormemente, por lo que las cifras citadas aquí son promedios (Brooke *et al.*, 1970).

Tal como se ha mencionado antes, los porcentajes de fibras ST y FT no son los mismos en todos los músculos del cuerpo. Generalmente los músculos de las extremidades superiores y de las inferiores de una persona tienen composiciones de fibras similares. Diversos estudios han demostrado que las personas con predominio de fibras ST en los músculos de sus piernas tendrán probablemente también un alto porcentaje de fibras ST en los músculos de sus brazos. Para las fibras FT existe una relación similar. Hay algunas excepciones, no obstante. El músculo sóleo (en la pantorrilla, por debajo de los gemelos), por ejemplo, está compuesto casi enteramente por fibras ST.

### **1.2.2. Tipos de fibras y Ejercicio Físico.**

Hemos visto las distintas maneras en que difieren las fibras ST (fibras rojas) y FT (fibras blancas). Basándonos en las diferencias existentes, podemos esperar que este tipo de fibras tenga también diferentes funciones cuando se está físicamente activo (Buchthal *et al.*, 1970).

**Fibras ST.** En general, las fibras musculares de contracción lenta tiene una elevada resistencia aeróbica (en presencia de oxígeno). Las fibras ST son muy eficientes en la producción de ATP a partir de la oxidación de los hidratos de carbono y de las grasas.

Recordamos que la ATP se necesita para producir la energía necesaria para la acción y la relajación muscular. Mientras dura la oxidación, las fibras ST continúan produciendo ATP, permitiendo que las fibras sigan activas. La capacidad para mantener la actividad muscular durante un periodo de tiempo prolongado es conocida como resistencia muscular, por lo que las fibras ST tienen una elevada resistencia aeróbica. Por ello, se movilizan con más frecuencia durante las pruebas de resistencia de baja intensidad, tales como las carreras de maratón o al nadar por la calle de una piscina.

**Fibras FT.** Por otro lado, las fibras de contracción rápida tienen una relativamente mala resistencia aeróbica. Están mejor adaptadas para rendir anaeróbicamente (sin oxígeno) que las fibras ST (Buchthal *et al.*, 1970). Esto significa que su ATP se forma a través de las vías anaeróbicas, no mediante la oxidación.

Las unidades motoras FTa generan considerablemente más fuerza que las unidades motoras ST, pero se fatigan fácilmente debido a su limitada capacidad de resistencia. Así, las fibras FTa parece que se usan principalmente durante las pruebas leves de resistencia de alta intensidad tales como la carrera de una milla o los 400 metros de natación.

Aunque la trascendencia de las fibras FTb no se conoce del todo, aparentemente no son activadas con facilidad por el sistema nervioso. Por ello, se usan más bien con poca frecuencia en las actividades normales de baja intensidad, pero se emplean predominantemente en las pruebas altamente explosivas (Buchthal *et al.*, 1970).

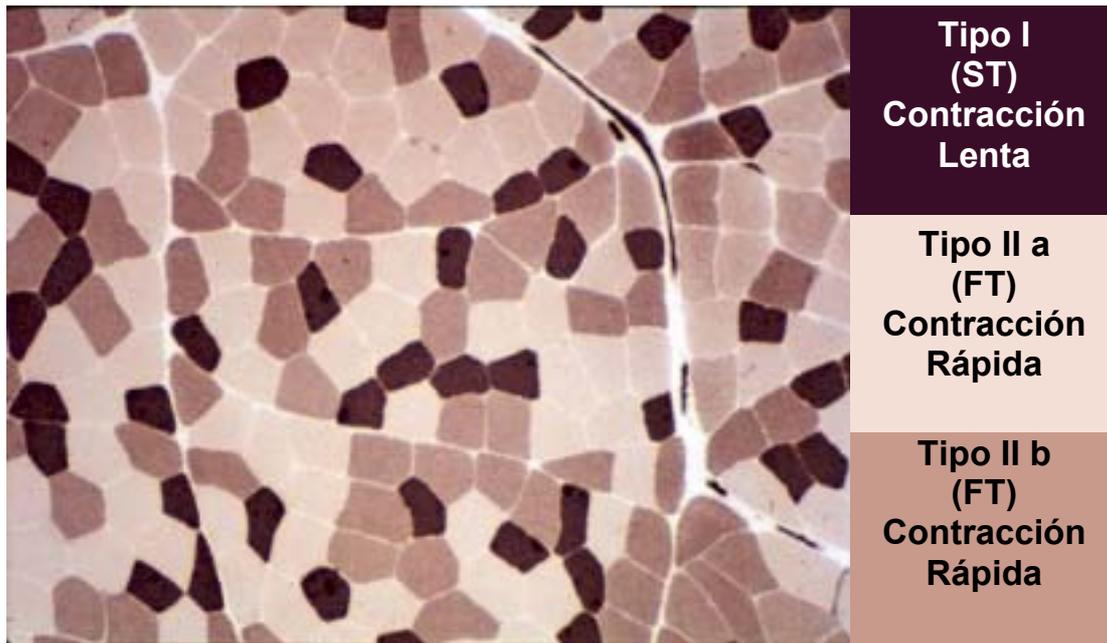


FIGURA 6. UNA FOTOMICROGRAFÍA MOSTRANDO FIBRAS MUSCULARES DE CONTRACCIÓN LENTA (ST) Y DE CONTRACCIÓN RÁPIDA (FT)

## 2. MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR

Muchas de las características de la contracción muscular se pueden demostrar especialmente bien mediante el desencadenamiento de *sacudidas musculares* únicas, que consiste en la excitación eléctrica instantánea del nervio de un músculo, o haciendo pasar un corto estímulo eléctrico a través del propio músculo. Esto da lugar a una única contracción brusca que dura una fracción de segundo (Martin *et al.*, 1998).

Las interacciones de la actina con la miosina producen una fuerza contráctil coherente, que convierte la energía química en trabajo mecánico. La energía para la contracción muscular proviene de la hidrólisis del ATP a ADP y fosfato inorgánico (Pi). Sin embargo no se detecta ninguna diferencia importante entre el nivel de ATP de un músculo en reposo y el de un músculo que se contrae activamente. Esto se debe a que en el citoplasma de la célula muscular existe un sistema de almacén muy eficiente para la regeneración del ATP. Existen niveles altos de otro compuesto de fosfato activo, la fosfocreatina, y el enzima creatina quinasa, que cataliza una reacción entre este compuesto

y el ADP, generando creatina y ATP (Bessman *et al.*, 1981). Así, tras un rápido aumento de la actividad muscular, es el nivel intracelular de fosfocreatina el que disminuye, aunque la maquinaria contráctil consume ATP. Por consiguiente, la reserva de fosfocreatina actúa suministrando energía al ATP igual que una batería, siendo recargado (cuando el músculo está en reposo) a partir del ATP que se genera en las oxidaciones celulares.

La hidrólisis de ATP durante la contracción muscular es una consecuencia directa de la interacción de la miosina con la actina. Incluso, por sí sola, la miosina actúa como un enzima que puede hidrolizar ATP (ATPasa).

El paso que limita la velocidad, no es ni la unión inicial del ATP a la miosina, ni la hidrólisis misma, pues ambas son extremadamente rápidas, sino la liberación de los productos de la hidrólisis del ATP (el ADP y el fosfato inorgánico, Pi). Estos permanecen estrechamente unidos formando un complejo no-covalente dentro de la molécula de miosina, que impide la unión y la hidrólisis posterior de más ATP. La actina estimula fuertemente la velocidad de hidrólisis del ATP por la miosina. En presencia de actina, cada molécula de miosina hidroliza entre 5 y 10 moléculas de ATP por segundo, valor comparable a los medidos en el músculo en contracción. La estimulación de la ATPasa de la miosina por parte de los filamentos de actina refleja una asociación física entre ambas. Esta asociación no afecta al paso en que la miosina hidroliza el ATP, sino que la actina provoca una liberación más rápida de ADP y del Pi de la molécula de miosina, la cual queda así libre para unir otra molécula de ATP e iniciar de nuevo la reacción (Adelstein *et al.*, 1980; Hartshorne *et al.*, 1982; Stein *et al.*, 1984).

Tanto la hidrólisis de ATP como la unión con la actina ocurren en la cabeza globular de la miosina. Las dos cabezas separadas (producidas por la rotura con papaína de la miosina) tienen unos 120 daltons cada una y, como ya se comentó, reciben el nombre de subfragmento 1 de miosina (Fragmento S1). Ya hemos comentado anteriormente que estas cabezas conservan toda la actividad ATPasa y las propiedades de unión con la actina, de forma que se

pueden utilizar para estudiar la interacción entre la actina y la miosina (Adelstein *et al.*, 1980).

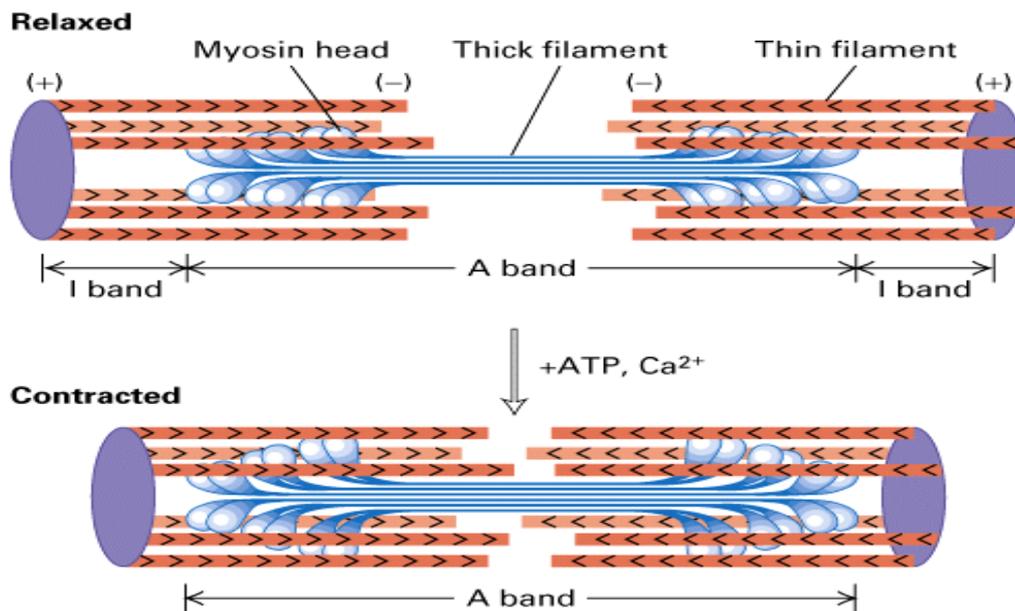


FIGURA 7. IMAGEN DESCRIPTIVA DE LA CONTRACCIÓN Y RELAJACIÓN MUSCULAR.

Los filamentos gruesos y delgados se deslizan unos con respecto a otros produciendo la fuerza mecánica para la contracción muscular. Este mecanismo molecular ha sido estudiado por diversos autores (Ford *et al.*, 1977; Eisenberg *et al.*, 1978; Eisenberg *et al.*, 1980) que evalúan el siguiente modelo: una cabeza de miosina, portadora de los productos de una hidrólisis anterior del ATP (ADP y Pi), se desplaza desde su posición en el filamento grueso hasta la proximidad inmediata de una subunidad vecina de actina. Se cree que este movimiento ocurre por difusión fortuita y que requiere flexibilidad de la molécula de miosina proporcionada por sus zonas "bisagra". Cuando la miosina se une con la actina, el ADP y el Pi se liberan de la cabeza de miosina, haciendo que esta se incline, empujando así a todo el resto del filamento grueso. Al final de este "golpe de fuerza", una nueva molécula de ATP se une a la cabeza de miosina y la separa de nuevo del filamento de actina. La hidrólisis del ATP unido relaja rápidamente la cabeza de miosina hasta su conformación original, y la prepara para un segundo ciclo (Huxley *et al.*, 1983) (Figura 7).

## 2.1. ESTIMULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR: PAPEL DEL CALCIO.

La sustancia crucial que estimula la contracción no es el ATP, que generalmente está disponible en la miofibrilla, sino el  $\text{Ca}^{2+}$ . Para comprender cómo regula el calcio la contracción muscular, debemos examinar la estructura molecular del filamento delgado con un poco más de detalle.

Un filamento delgado, como el que se encuentra en el músculo estriado, es algo más que un simple polímero de actina F. Hay otras cuatro proteínas, que son esenciales para la función contráctil de los filamentos delgados. Una de estas proteínas es la Tropomiosina, una proteína fibrosa que se encuentra en forma de dímeros alargados, situados a lo largo del surco de la hélice de actina F o cerca del mismo. Unida a dicha molécula nos encontramos a tres proteínas pequeñas denominadas troponinas I, C y T. La presencia de las tropomiosinas y de las troponinas inhibe la unión de las cabezas de miosina a la actina, a menos que haya calcio en una concentración de aproximadamente  $10^{-5}$  M. En el músculo en reposo, las concentraciones de calcio están próximas a  $10^{-7}$  M, por lo que no pueden formarse nuevos puentes cruzados (Martin *et al.*, 1998).

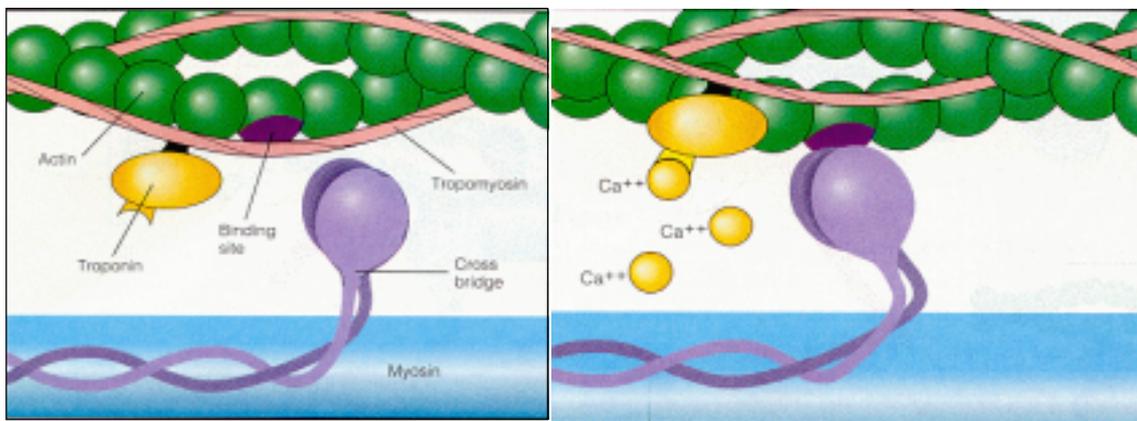


FIGURA 8. REGULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR POR EL CALCIO.

Una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la contracción, por que el ion se une a la troponina C, lo que da lugar a un reordenamiento del complejo troponina-tropomiosina. Este desplazamiento hace disponibles lugares nuevos en la actina para la unión por las cabezas de miosina (Figura 8).

Hemos explicado la activación de la contracción muscular desde la entrada de calcio a las miofibrillas; pero por qué se produce esta entrada. La respuesta puede hallarse con una observación más detallada de la célula muscular. En el interior de la célula, cada miofibrilla está rodeada por una estructura denominada retículo sarcoplásmico, formada por túbulos membranosos. Como hemos comentado, en los músculos en reposo, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la miofibrillas se mantiene aproximadamente en  $10^{-7}$  M, mientras que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la luz del retículo sarcoplásmico puede ser 10 000 veces mayor. Los impulsos de los nervios motores despolarizan la membrana del retículo sarcoplásmico, con lo que se abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y se vierte el calcio fuera de la luz en las miofibrillas, estimulando la contracción. La señal se transmite rápidamente a todo el retículo sarcoplásmico de una miofibrilla, a través de los túbulos T (Rayment *et al.*, 1994).

Aunque un cambio brusco de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es la señal universal para la contracción muscular, evidentemente no puede proporcionar de por sí la energía necesaria.

## 2.2. EFICACIA DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR

La eficacia de una máquina o de un motor, se calcula como el porcentaje de energía aportada que es convertido en trabajo y no en calor. El porcentaje de la energía aportada al músculo (la energía química de los nutrientes) que se puede convertir en trabajo, incluso en las mejores condiciones, es inferior al 25%, mientras que el resto se convierte en calor. La razón de esta baja eficiencia reside en que alrededor de la mitad de la energía de los nutrientes se pierden durante la formación de ATP e, incluso entonces, tan sólo un 40-45% de la energía del propio ATP se puede convertir posteriormente en trabajo (Clarkson *et al.*, 1996) (Figura 9).

Tan sólo se consigue una eficiencia máxima cuando el músculo se contrae a una velocidad moderada. Si el músculo se contrae lentamente o sin movimiento alguno, durante la contracción se liberan grandes cantidades de

calor de mantenimiento, aunque el trabajo realizado sea escaso o nulo, por lo que disminuye la eficacia. Por otra parte, si la contracción es demasiado rápida, una gran proporción de la energía se utiliza para vencer la fricción por viscosidad dentro del propio músculo, lo cual también reduce el rendimiento de la contracción. Por lo común, la eficacia máxima se alcanza cuando la velocidad de contracción es de alrededor un 30% del máximo (Epstein *et al.*, 1998).

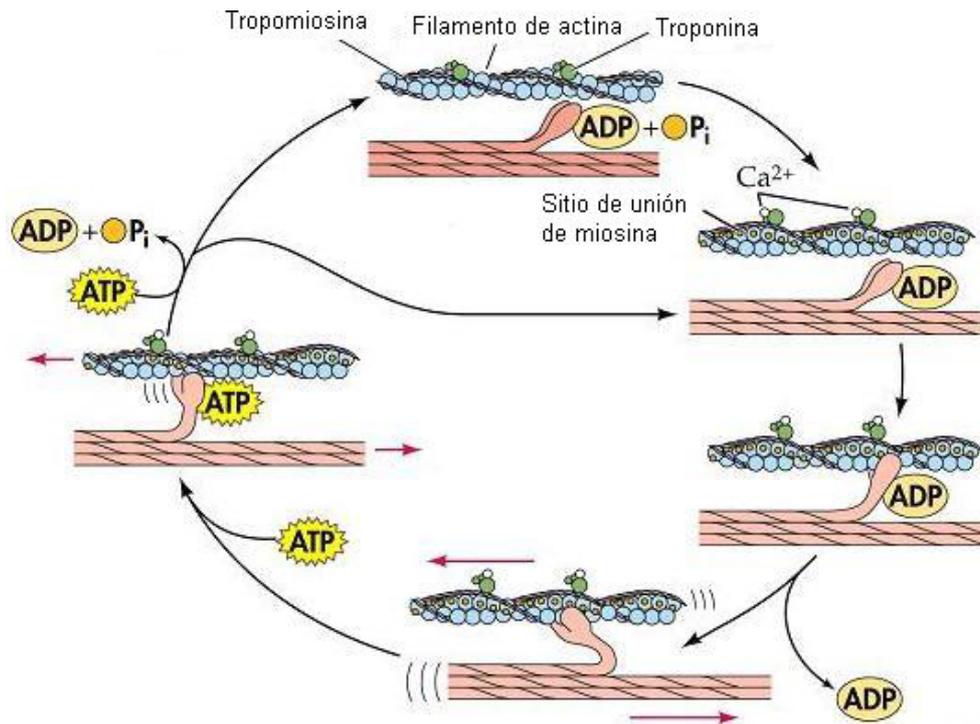


FIGURA 9. MECANISMO MOLECULAR DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR

### 2.3. TIPOS DE CONTRACCIÓN MUSCULAR.

Tradicionalmente, se definen los siguientes tipos de contracción muscular o acción muscular empezando con el prefijo “iso” (que significa igual): **isotónica** (tensión muscular constante), **isométrica** (longitud muscular constante) e **isocinética** (velocidad de movimiento constante). Además, el movimiento se puede producir bajo condiciones **concéntricas** (acortamiento muscular) y **excéntricas** (elongamiento muscular) (Johnson *et al.*, 1976).

**Isométrico** significa literalmente “igual longitud”, un estado que sólo se produce cuando un músculo está relajado. De hecho, no es la longitud muscular sino el ángulo articular lo que permanece constante. Una contracción isométrica se puede definir de forma más precisa como una contracción muscular que tiene lugar cuando no existe un movimiento externo o un cambio en el ángulo articular. Se produce cuando la fuerza producida por un músculo equilibra exactamente la resistencia impuesta sobre él y sin producirse ningún movimiento. Aunque no es incorrecto, el término isométrico se podría sustituir por la palabra estático, sin sacrificar ningún rigor científico.

**Isotónico:** dicho término debería evitarse en la mayoría de las ocasiones, ya que es virtualmente imposible que la tensión muscular permanezca igual mientras se produce el movimiento articular a lo largo de cualquier movimiento. Una tensión constante, es sólo posible durante una corta amplitud de movimiento y bajo unas condiciones de movimiento muy lentas o cuasi-isométricas, durante un tiempo limitado (ya que la fatiga disminuye rápidamente la tensión). Siempre que se produce un movimiento, la tensión muscular aumenta o disminuye, ya que la aceleración o deceleración está siempre presente y puede activarse uno de los reflejos del estiramiento.

**Isocinético:** un término utilizado de forma inadecuada en la mayoría de los casos, ya que resulta imposible producir una contracción muscular completa a una velocidad constante. Para realizar cualquier movimiento desde el reposo, las dos primeras leyes del movimiento de Newton revelan que debe integrarse cierta aceleración, de forma que una velocidad constante no puede existir en un músculo que se contrae desde el reposo y retorna a este estado. La velocidad constante sólo se puede producir durante una parte del movimiento.

Una contracción muscular **concéntrica**, se refiere a una acción muscular que produce una fuerza para superar la carga que actúa sobre ella. Por esta razón, científicos rusos la denominan contracción por superación. El trabajo realizado durante la contracción concéntrica se describe como positivo (Doyle *et al.*, 1993).

Una contracción **excéntrica** se refiere a la acción muscular por la cual la fuerza muscular cede a la carga impuesta, definiéndose también como una contracción por cesión. El trabajo realizado durante la contracción excéntrica se considera negativo (Sven *et al.*, 1998).

Esta clasificación es importante, porque los ejercicios se clasificarán según el tipo de contracción que predomine, y se ha observado que el ejercicio excéntrico produce más daño oxidativo que el concéntrico (Newham *et al.*, 1983; Newham *et al.*, 1986; Armstrong, 1986; Armstrong, 1990).

Un factor poco valorado en relación con la contracción muscular excéntrica es que la tensión muscular sobre cualquier movimiento completo es menor en la fase excéntrica que en la fase isométrica o concéntrica (Friden *et al.*, 1983); aun así, la actividad excéntrica se identifica generalmente como la causa principal del daño muscular (Whitehead *et al.*, 1998). Ciertamente, una contracción muscular excéntrica máxima puede generar una tensión muscular hasta un 30-40 % mayor que una contracción concéntrica o isométrica. Sin embargo, este grado de tensión no se produce durante la fase excéntrica en acciones deportivas normales (Sven *et al.*, 1998) Evidentemente resultaría temerario considerar que nuestro conocimiento actual en lo que se refiere a los aspectos de la contracción muscular es el requerido para proporcionar una óptima rehabilitación o acondicionamiento físico

	<b>Excéntrico</b>	<b>Isométrico</b>	<b>Concéntrico</b>
<b>Movimientos del músculo</b>	<b>Alargamiento</b>	<b>Estático</b>	<b>Acortamiento</b>
<b>Fuerzas mecánicas</b>	<b>Altas</b>	<b>Bajas</b>	<b>Bajas</b>
<b>Actividad eléctrica</b>	<b>Baja</b>	<b>Alta</b>	<b>Alta</b>
<b>Coste metabólico</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Alto</b>
<b>Tendencia a inducir daño muscul.</b>	<b>Alta</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>
<b>Tendencia a inducir fatiga</b>	<b>Alta</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>
<b>Tendencia a inducir dolor</b>	<b>Alta</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>

FIGURA 10. CARACTERÍSTICAS DE DIFERENTES TIPOS DE ACTIVIDAD CONTRÁCTIL.

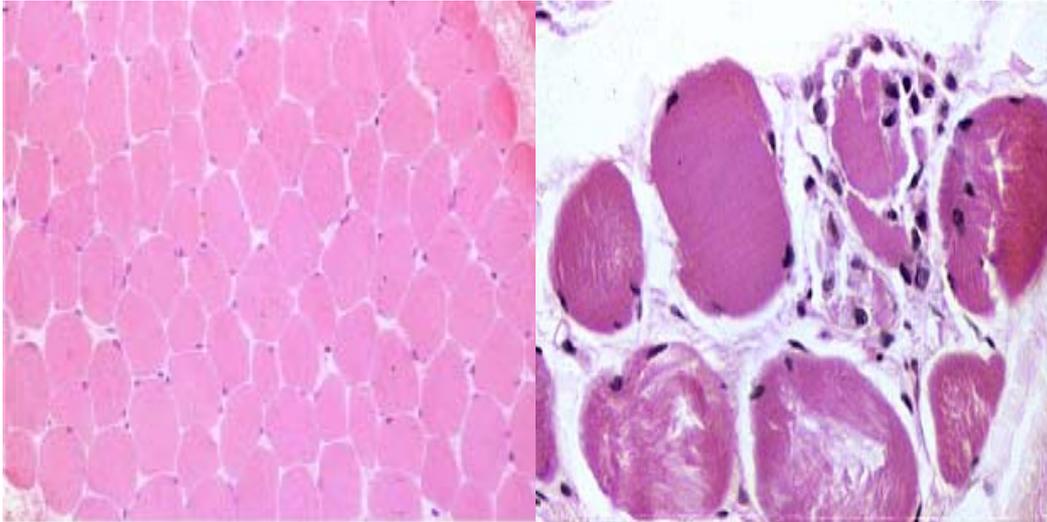
### 3. DAÑO MUSCULAR

Las etapas de sobreentrenamiento constituyen actualmente un motivo de consulta frecuente en medicina del deporte. En su origen se encuentra siempre una carga de entrenamiento importante, mal tolerada por el organismo (Fry *et al.*, 1991). Las consecuencias de esta programación inadecuada, a veces son reforzadas por otros factores que van a aumentar las dificultades específicas generadas por el entrenamiento (Kenttä *et al.*, 1998). La reversibilidad de las señales clínicas y la gravedad del sobreentrenamiento dependen de su duración y evolución. La sintomatología es polimorfa, inespecífica, engañosa y de evolución lenta. Así pues, puesto que la gravedad de este efecto depende en gran parte de la rapidez de la asistencia sanitaria, el principal problema reside en su diagnóstico precoz (Figura 11).

La búsqueda de marcadores biológicos de las lesiones musculares, clásicamente forma parte del diagnóstico del estado de sobreentrenamiento. Sin embargo, la relación existente, entre las lesiones celulares inducidas por el ejercicio único o repetido y el sobreentrenamiento, no es clara. Dicha relación debe ser reexaminada en particular a la luz de recientes datos experimentales.

Estudiar las relaciones que pueden existir entre lesiones musculares debidas al ejercicio y al sobreentrenamiento, implica responder a tres grandes preguntas:

- ¿Existen marcadores fieles, sensibles y reproducibles de las lesiones de las fibras musculares?
- ¿Las variaciones de estos marcadores biológicos se correlacionan con la gravedad de las lesiones histológicas?
- ¿El aumento de estos marcadores está asociado a un estado de sobreentrenamiento?



**FIGURA 11. IMAGEN DE MÚSCULO ESQUELÉTICO NORMAL Y MÚSCULO CON DAÑO MUSCULAR.**

### **3.1. CARACTERÍSTICAS DEL DAÑO MUSCULAR INDUCIDO POR EL EJERCICIO**

El ejercicio físico intenso induce lesiones de las fibras musculares, donde la gravedad depende de la duración del ejercicio, sus características y de la etapa de entrenamiento en la que se encuentre el deportista (Asp *et al.*, 1996).

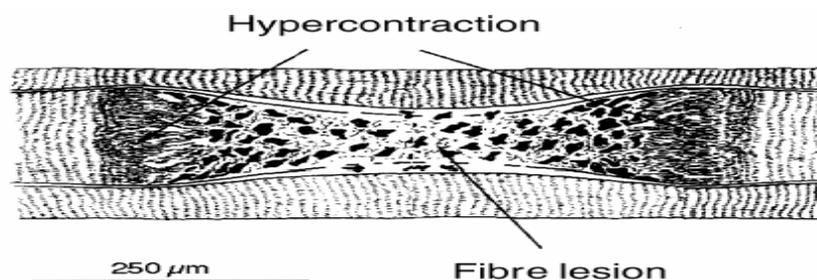
El método de contracción muscular influye sobre la gravedad y el alcance de las lesiones. Las contracciones musculares repetidas, utilizando el método excéntrico (contracción del músculo mientras que éste se alarga), son la causa de dolores difusos persistentes y extendidos en el tiempo. Los ejercicios dinámicos, que implican un componente excéntrico, representan un verdadero factor de riesgo de lesión muscular (Fry *et al.*, 1991).

El predominio de las lesiones musculares en el ejercicio es muy difícil de considerar a nivel clínico. Estas lesiones estructurales, cuya gravedad y evolución son muy variables, se caracterizan por simples dolores remanentes de las masas musculares y a veces por una sensación de pesadez persistente de los miembros inferiores (Ebbeling *et al.*, 1989).

La expresión clínica de esta patología es inespecífica, y por consiguiente, su impacto en el terreno deportivo sigue siendo muy difícil a evaluar.

Las lesiones musculares en el ejercicio físico se caracterizan en el hombre por dolores desplazados en el tiempo, una tensión muscular, una limitación de los movimientos, una reducción de los resultados y la presencia de enzimas musculares en la sangre (Kuipers *et al.*, 1993). El diagnóstico biológico de estas lesiones sigue siendo difícil por falta de especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de los parámetros disponibles en la práctica corriente (Figura 11). Las características histológicas del músculo perjudicado a nivel histológico, las graves lesiones musculares vinculadas a la práctica del ejercicio se presentan al principio como lesiones estructurales concentradas en las miofibrillas y el citoesqueleto (Friden *et al.*, 1983) (Figura 11).

En microscopía electrónica o en microscopía a grandes aumentos, estas lesiones se presentan como placas claras que borran los sarcomeros, y son evocadoras de rupturas de las estructuras proteicas de apoyo de fibra, incluidas la desmina y la laminina. Estas lesiones que son al principio circunscritas a los sarcomeros, evolucionan muy rápidamente y son el origen de una reacción inflamatoria que da lugar a un proceso de reparación de los tejidos orgánicos (Vijayan *et al.*, 1998). En los casos más severos, las células perjudicadas se comprometen en un proceso de muerte celular y van a ser sustituidas por fibras recientemente formadas a partir de células satélites.



**FIGURA 12. IMAGEN ESQUEMÁTICA DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE LA FIBRA MUSCULAR CON DAÑO EN UN SEGMENTO RODEADO POR DOS FIBRAS NORMALES.**

Los mecanismos del origen de estas lesiones permanecen aún mal definidos hasta ahora (Kuipers *et al.*, 1993). Sin embargo, se avanzaron tres grandes hipótesis, de origen mecánico, metabólico y/o vascular.

La hipótesis que parece prevalecer hasta ahora es de tipo físico y se basa en el papel nocivo de las tensiones mecánicas sobre las estructuras celulares. Como lo precisamos más arriba, las lesiones musculares ocurren principalmente después de la práctica de ejercicios que contienen un gran componente excéntrico. Ahora bien, en este método de contracción, el pico de fuerza corresponde a una longitud superior que la que le corresponde a los puentes de actina-miosina (Mac Cully *et al.*, 1986). Por lo tanto, una fuerza más importante aplicada sobre cada puente de actina- miosina podría suponer el origen de las lesiones en el ejercicio físico. Se propuso otra hipótesis, donde se observó una gran heterogeneidad de la longitud de los sarcómeros en el curso de la contracción de tipo excéntrico.

Algunos sarcómeros se encontrarían estirados más allá de la resistencia de las estructuras elásticas de la fibra, lo que sería la causa de la ruptura del sarcolema. Se encuentra por otra parte una alteración de la estructura de los sarcómeros que habitualmente es el origen de las lesiones (Ogilvie *et al.*, 1988).

Sin embargo, algunas actividades físicas realizadas como descarga también se asocian a lesiones musculares (Hartobagyi *et al.*, 1989). Aunque estas lesiones son de una gravedad menor, esto ha conllevado a hacer una hipótesis en la que otros mecanismos, que no son factores mecánicos, pueden explicar el desarrollo de lesiones en el ejercicio.

### **3.2. REACCIÓN INFLAMATORIA PRECOZ.**

Una serie de acontecimientos van a seguir a estas lesiones iniciales, por los cuales el calcio y los radicales libres un papel esencial. Muy pronto, las alteraciones de las estructuras membranosas van a tener como consecuencia el aumentar la concentración del calcio intracelular. A continuación, se produce

una perturbación de la relajación muscular y una acumulación de calcio en la mitocondria (Duan *et al.*, 1990). La función mitocondrial es alterada profundamente, lo que se traduce en una alteración de la síntesis de ATP. Esta ruptura de la síntesis de ATP afecta al funcionamiento de las bombas iónicas Atp-dependientes, que limita la salida del sodio e induce un edema de las fibras lesionadas. Por último, el aumento del calcio intracelular es la causa de una activación del sistema proteolítico como el de la fosfolipasa 2 o la calpaina. Esta última es una proteasa no lisosomal que está muy implicada en el desarrollo de las lesiones vinculadas al ejercicio físico (Belcastro *et al.*, 1998).

Después de que se produzcan las lesiones iniciales, se desarrolla un estado inflamatorio local, que es esencial para pasarlo a ser del músculo y que permite la instauración de la primera fase de "reparación" de los tejidos orgánicos (Tiidus *et al.*, 1998; Stauber *et al.*, 1998).

La producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) constituye uno de los factores que desencadenan la reacción inflamatoria. Por otra parte, la producción inicial de radicales libres, provocada por el aumento del consumo de oxígeno por las mitocondrias, activa los mensajeros que atraen las células polinucleadas neutrofilas, aumentan la permeabilidad vascular y contribuyen así a la infiltración del tejido dañado por estas células. Una vez finaliza el ejercicio intenso, los neutrofilos polinucleares emigran al músculo. La producción local de radicales libres es mantenida y ampliada, por el hecho de que los propios leucocitos neutrofilos pueden ser la causa directa de la producción de sustancias reactivas al oxígeno (Jaeschke *et al.*, 1995). Las especies reactivas al oxígeno desempeñan así un papel fundamental en el origen y el desarrollo de la reacción inflamatoria post orgánica (Atalay *et al.*, 1996).

A nivel histológico, esto se traduce en alteraciones histomorfologicas que provocan el decaimiento muscular, siendo característica la aparición de agregados de células mononucleadas, que en algún momento invadieron algunas fibras musculares (Bigard *et al.*, 1997).

### 3.3. LAS CÉLULAS SATÉLITE

Representan las únicas células miogénicas potenciales presentes en el estado adulto (Plaghki *et al.*, 1985). El origen ontogénico de las células satélite merece mencionarse. En el curso del desarrollo, las fibras musculares son formadas por la fusión de mioblastos que garantizan la formación de miotubos y después de inervarse, estos miotubos adquieren las características de fibras musculares maduras. Los miotubos, en el embrión, aparecen en dos "olas sucesivas". Las células miogénicas primitivas aparecen muy pronto durante la histogénesis muscular, y se fusionan para formar miotubos de primera generación (Rubinstein *et al.*, 1981). Otras células mioblásticas permanecen en el músculo esquelético para fusionarse con las fibras musculares ya constituidas (de primera o de segunda generación) (Allen *et al.*, 1990), o para formar células quiescentes, llamadas células satélite.

Estas células están presentes en todos los tipos de músculo estriado, excepto el miocardio, y se localizan entre el sarcolema y la membrana basal de la fibra; resisten extraordinariamente a las agresiones bioquímicas o físicas, y se activan rápidamente en caso de lesión. La reacción de activación de estas células quiescentes se caracteriza por un aumento del volumen del núcleo y la síntesis de ADN (Carlson *et al.*, 1983), gracias a la acción de factores de crecimiento locales, (bFGF, insulin-like growth factors IGFs, ou transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) (Hurme *et al.*, 1992). Las células satélite se multiplican, lo que explica, al menos en parte, el aumento del número de núcleos de las fibras dañadas (Jacobs *et al.*, 1995) (Figura 13).

Después de la desaparición de los restos celulares de las fibras dañadas, el proceso de rejuvenecimiento comienza bajo la membrana basal, mantenida generalmente intacta. Las células satélite que representan la fuente principal de las células miogénicas que van a garantizar el rejuvenecimiento muscular (Snow *et al.*, 1977).

Además, parece que sean las células satélites presentes cerca de la lesión, la causa de la formación de las nuevas fibras musculares, y que en

estas circunstancias, la contratación de células satélite a distancia no sea un fenómeno de una gran importancia (Schultz *et al.*, 1985). Se considera generalmente que en los mamíferos adultos, los procesos de rejuvenecimiento muscular reproducen los distintos acontecimientos celulares que se suceden durante del miogénesis (Plaghki *et al.*, 1985). Numerosos factores miogénicos como myoD, myf5 y myf6 se expresan durante el rejuvenecimiento, participando así en la maduración de las nuevas fibras musculares (Miller *et al.*, 1991).

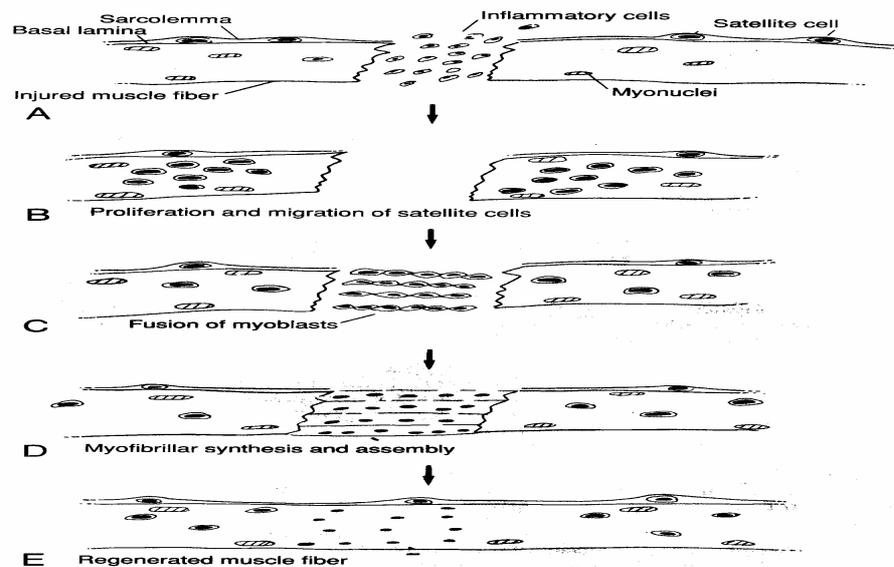


FIGURA 13. PROCESO DE REGENERACIÓN MUSCULAR.

### 3.4. EL ORIGEN METABÓLICO DE LAS LESIONES MUSCULARES

Dicho origen se basa en dos hipótesis:

**La primera** está vinculada a un fallo de los procesos oxidativos en la síntesis del ATP. El ejercicio de larga duración, se traduce al final en una alteración de la función mitocondrial, que tendría como consecuencia un fallo en las bombas iónicas ATP-dependientes del retículo sarcoplasmático, y un defecto de la salida del calcio de la célula. La subida de los niveles del calcio intracelular, sería la causa de las lesiones estructurales, probablemente por la activación de proteasas del calcio-dependientes (Belcastro *et al.*, 1998). Sin embargo, algunos argumentos van en contra de esta hipótesis, en particular el hecho de que las lesiones más extendidas y las más importantes, son

observadas a lo largo del ejercicio de tipo excéntrico que son los menos costosos en energía (Armstrong *et al.*, 1984).

**La segunda hipótesis** es de tipo metabólico, y está vinculada al aumento de la producción de radicales libres durante el ejercicio (Jenkins *et al.*, 1988). El aumento del consumo de oxígeno se traduce en un aumento de la producción de especies reactivas como son el oxígeno reactivo, o los radicales libres, o superóxidos (Sen *et al.*, 1995). En las condiciones normales, los radicales libres producidos, son inactivados por sistemas de defensa (enzimas), como por ejemplo el superóxido-dismutasa, la glutatión-peroxidasas.

En el ejercicio físico, se constata un aumento de la producción de hidrógeno peroxidasa y del radical hidroxil (O'Neil *et al.*, 1996). En estas circunstancias, los sistemas de defensa frente a ROS están sobrepasados y las especies reactivadas inestables reaccionan con las grandes moléculas estructurales, tales que los lípidos de membrana o algunas proteínas. Esta rápida respuesta se traducen en lesiones de las estructuras fosfolípidas de la membrana por peroxidación (Jenkins *et al.*, 1988). La permeabilidad de la membrana rompe los gradientes iónicos compatibles con la función celular, y todo esto va a favorecer muy especialmente al calcio, cuyo aumento intracelular va a activar el sistema de proteasas calcio-dependientes. Esta perturbación de la homeostasis cálcica intracelular, puede, fácilmente, explicar la alteración de los resultados musculares observados en un estado de cansancio. Sin embargo, teniendo en cuenta las numerosas dificultades técnicas, esta hipótesis no está confirmada claramente hasta hoy día.

**Por último, se propuso la hipótesis** de que una alteración en la microcirculación podía ser la causa de lesiones musculares. En realidad, se demostró claramente que las lesiones de la red capilar eran secundarias a las alteraciones de las miofibrillas (Peeze-Binkhorst *et al.*, 1989). La hipótesis vascular no la podemos considerar capaz de explicar el desarrollo de las lesiones musculares en el ejercicio, no más que el aumento de la temperatura del músculo (Armstrong *et al.*, 1991).

Otra cuestión parece surgir en estos últimos años, que se refiere al fenómeno de apoptosis en las lesiones musculares vinculadas al ejercicio (Carraro *et al.*, 1997). En efecto, se ha sugerido, que el desarrollo de un proceso apoptótico inadecuado pudiera explicar, al menos en parte, las lesiones musculares que se producen por la práctica de ejercicio físico intenso. La apoptosis (o muerte celular programada) puede definirse como el resultado de la aplicación de un programa bioquímico complejo que consigue la muerte celular. En el estado normal, este programa bioquímico se controla estrictamente para garantizar la sustitución de las células muertas, sin tocar la estructura celular del tejido en cuestión. Importantes teorías experimentales permiten pensar que en ratones defectuosos, con distrofia (que representan un modelo de miopatía de Duchenne), las lesiones musculares observadas después de un ejercicio programado apoptótico. (Sandri *et al.*, 1995). La pregunta sobre los mecanismos íntimos vinculados al origen de las lesiones musculares como consecuencia del ejercicio intenso, aceleración de los procesos de muerte celular programada, de origen metabólico o puramente mecánico, permanece abierta.

### **3.5. RELACIÓN ENTRE LESIONES MUSCULARES Y SOBREENTRENAMIENTO.**

La relación existente entre las lesiones musculares inducidas por el ejercicio y el sobreentrenamiento puede parecer sencilla de evaluar. Sin embargo, recientes investigaciones nos hacen pensar que las lesiones inducidas por el ejercicio físico repetido, pueden tener consecuencias importantes que se integren en la expresión clínica del sobreentrenamiento. Estas relaciones no pueden ser tan simples de definir.

➤ **El Sobreentrenamiento:** Ante distintas situaciones de dificultad, el organismo desarrolla dos tipos de reacción, en función de su estado de tolerancia. Estos dos tipos de reacción se caracterizan, o por el desarrollo de mecanismos de adaptación, o por la aplicación de mecanismos de defensa que entren en el marco general de un estado de estrés. La tolerancia del individuo, es modulada por su experiencia y sus diferentes situaciones de dificultad vividas, así como por su perfil psicológico. Cuando los factores de dificultad son

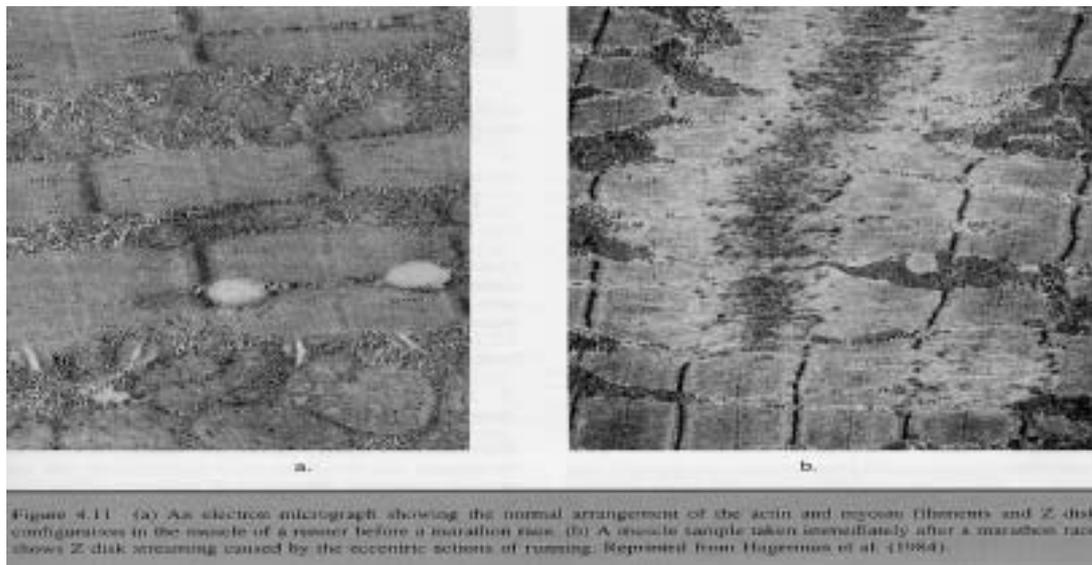
intensos, repetidos, o cuando el organismo es incapaz de desarrollar mecanismos de adaptación, un estado de tensión se desarrolla, generalmente de tipo inmunitario neuroendocrino. Este estado puede inducir a una patología a veces grave como, por ejemplo, el sobreentrenamiento. Un desequilibrio en los programas de entrenamiento, una carga demasiado importante de trabajo deportivo, pueden traducirse en el desarrollo de un estado de sobreentrenamiento (Kenttä *et al.*, 1998). Este estado de intolerancia al ejercicio repetido, se presenta en forma de distintos cuadros clínicos a veces severos, que constituyen síndromes endocrinos, metabólicos, inmunitarios y/o psiquiátricos. Así pues, el entrenamiento físico se traduce, o por el desarrollo de mecanismos de adaptación, o por la aparición de estados de desregulación y de desadaptación, en el sobreentrenamiento.

¿Las lesiones musculares inducidas por el ejercicio, pueden ser atribuidas a una de las manifestaciones del sobreentrenamiento?. El organismo tolera la práctica de ejercicios intensos, de larga duración y repetidos, sobre todo las carreras de la larga distancia. Esto puede traducirse en el desarrollo de lesiones musculares que provoquen el decaimiento de algunas fibras musculares, y su sustitución por nuevas fibras formadas a partir de las células satélite.

Existe una importante susceptibilidad personal a las variaciones de los programas de entrenamiento, y todos los sujetos sometidos a un aumento brutal de la carga de trabajo no van a desarrollar manifestaciones clínicas de sobreentrenamiento. Otros factores se han identificado, que pueden explicar la aparición de signos clínicos de sobreentrenamiento. Un entrenamiento monótono, un desequilibrio alimenticio, un medio ambiente climático vinculante, estrés psicológicos pueden explicar el estado de sobreentrenamiento (Urhausen *et al.*, 1998). Las altas cargas de entrenamiento pueden traducirse en lesiones musculares y la liberación de enzimas sarcoplasmáticos en el plasma (Kuipers *et al.*, 1988).

Las fases del entrenamiento de alta intensidad, se traducen generalmente en un aumento de la actividad del CK plasmática de 2 a 10 veces

que en condiciones de reposo. (Misner *et al.*, 1973). No obstante, existe un amplio consenso para reconocer que estas variaciones de la actividad del CK, no pueden considerarse nunca como marcadores del sobreentrenamiento, y eso por varias razones: en primer lugar, porque la presencia de estas enzimas en el plasma no representa un reflejo fiel de la amplitud y la naturaleza de las lesiones musculares post ejercicio; finalmente porque no se asocia a algunos estados de sobreentrenamiento, clínicamente confirmados con señales biológicas de lesiones musculares (Kuipers *et al.*, 1988) (Figura 14).



**FIGURA 14. (A) IMAGEN NORMAL DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA Y MIOSINA Y DISCOS Z. (B) IMAGEN LOS FILAMENTOS DE ACTINA Y MIOSINA DESPUÉS DE UNA MARATÓN.**

Como lo precisamos más arriba, la falta de sensibilidad y reproductividad de la actividad de CK conduce a considerar con mucha prudencia las variaciones de este parámetro biológico. No es posible evaluar el alcance de las lesiones musculares inducidas por el ejercicio sobre la base exclusivamente de las variaciones de este parámetro. Por otra parte, este parámetro no es específico de las microlesiones musculares vinculadas a la práctica intensa del ejercicio, y la actividad de CK plasmática puede también aumentar después de contusiones musculares directas o traumatismos (Bigard *et al.*, 2001).

En resumen, el ejercicio físico intenso, prolongado, sobre todo si implica un importante componente excéntrico, es la causa de lesiones musculares. La

gravedad de estas lesiones es variable y puede traducirse en la simple fuga de enzimas sarcoplasmáticos encontrados en la sangre que circula, o en verdaderas lesiones degenerativas que afectan en un alto porcentaje de fibras musculares.

### **3.5.1. MODIFICACIONES BIOQUÍMICAS PRODUCIDAS POR EL SOBREENENTRENAMIENTO.**

Cada vez son más los autores que piensan que las pequeñas alteraciones originadas en el sistema osteomuscular y especialmente las que afectan a las fibras musculares, son las iniciadoras del síndrome de sobreentrenamiento (SSE).

A esta clase de lesiones se las conoce como microtraumas adaptativos y suelen ser producidas en el músculo por las contracciones excéntricas y concéntricas; y en el sistema articular por los elevados volúmenes de trabajo en las que se haya implicado. El calificativo de adaptativas, se les aplica por considerarlas un proceso inflamatorio, cuyo destino final no es otro, que la curación del microtrauma (Bigard *et al.*, 2001)

El ejercicio excéntrico, además de producir agujetas, disminuye la fuerza máxima del músculo y produce fatiga de baja frecuencia. Del mismo modo produce alteraciones de la banda Z en las miofibras, inflamación de las mitocondrias, aumento de la presión intramuscular, alteración de la síntesis de novo del glucógeno, incremento de la relación fósforo inorgánico/fosfocreatina, y elevación de los niveles de lactato durante el reposo (Friden *et al.*, 1983).

De cualquier manera, varios autores entre los que se encuentra Smith consideran que el daño muscular constituye la causa inicial del síndrome de sobreentrenamiento (SSE), y a la vez, la que le perpetúa.

Parece ser que las citoquinas, se hallan implicadas en el desarrollo del SSE. Las estructuras traumatizadas por el entrenamiento (músculo, tejido conectivo o hueso) sintetizan estas moléculas, que son las encargadas de

coordinar los diferentes sistemas para promover la recuperación de los tejidos dañados. Durante la respuesta aguda del organismo al entrenamiento, los mecanismos celulares periféricos se hallan implicados primordialmente en aportar el suministro de energía, e involucran a las reacciones asociadas a la producción de citoquinas y de hormonas.

El SSE de resistencia puede ser el resultado de una serie de alteraciones sucesivas y acumulativas del metabolismo en el músculo esquelético, las cuales se hacen crónicas durante el entrenamiento. La iniciación de este proceso la constituye una alteración del metabolismo de los carbohidratos. En el transcurso de los ejercicios de resistencia las cadenas de sacáridos de dos glucoproteínas de la sangre: la macroglobulina alfa-2 y la glucoproteína ácida alfa-1, disminuyen o modifican sus cualidades. Probablemente dichas glucoproteínas se utilizan en el transcurso de la combustión de los depósitos hepáticos de glucógeno durante el ejercicio, a lo que le sigue la disminución de los ácidos grasos de cadena media, hecho que puede estar relacionado con la alteración de la síntesis de los ácidos grasos de cadena larga en el hígado (Bigard *et al.*, 2001).

En el descenso del glucógeno muscular originado por los entrenamientos intensos, no sólo interviene el aumento del consumo originado por el esfuerzo deportivo, sino que también es posible que el daño subagudo localizado en las fibras, a consecuencia de las contracciones excéntricas, pudiera disminuir la proteína transportadora de la glucosa GLUT-4, en la miocélula, e interferir con la síntesis del glucógeno. La disminución del glucógeno muscular, además de contribuir al sobreentrenamiento, facilita la captación excesiva de los aminoácidos de cadena ramificada y favorece su oxidación en las miofibras, lo que disminuye su disponibilidad para sintetizar los neurotransmisores centrales, hecho que podría estar relacionado con la fatiga de origen cerebral

Además, la disminución del glucógeno muscular causada por el ejercicio intenso y prolongado se relaciona con el aumento de la expresión local de las citoquinas (IL-6), disminución de la expresión de los transportadores de la

glucosa, con el aumento del cortisol, y la disminución de la secreción de la insulina y la estimulación beta-adrenérgica. Por otra parte, la leptina ejerce efectos importantes sobre el hipotálamo e interviene en la regulación del metabolismo hormonal del ejercicio y el entrenamiento.

El daño muscular producido por el ejercicio y el proceso de reparación que le sigue estimulan la expresión de las citoquinas inflamatorias, como el TNF-alfa, y proteínas del estrés (HSP-72). Durante los estados de supercompensación y sobreentrenamiento, se observa en el músculo esquelético la existencia de un proceso similar a la miopatía, en el que el recambio de las proteínas contráctiles se encuentra disminuido.

La etapa última del proceso de sobreentrenamiento concluye con el catabolismo de las proteínas. Ello puede significar, que en el dinerote de sobreentrenamiento (SSE) se produce una derivación del uso de los carbohidratos y las grasas, hacia las proteínas, con la liberación de la energía necesaria para ser utilizada por los músculos durante el ejercicio prolongado aerobio (Bigard *et al.*, 2001).

Al final, el proceso inflamatorio termina por afectar al hígado, al cerebro y al sistema inmunitario. En el hígado, la inflamación sistémica estimula la síntesis de una serie de proteínas, conocidas como proteínas de la fase aguda, que complican aún más el problema. Sin embargo, en los deportes de equipo (fútbol) no parece existir una respuesta de fase aguda a consecuencia del entrenamiento (Allen *et al.*, 1990)..

Los ejercicios que soportan el peso del cuerpo, como las carreras pedestres, también causan daño muscular. Algunos autores como Allen y Keenan en 1990 achacan la autoría de algunas de estas lesiones al ácido úrico (Allen *et al.*, 1990).

A continuación de actividades aerobias de larga duración, como el maratón, es frecuente observar un aumento en el plasma sanguíneo de la creatina fosfoquinasa y de la mioglobina, como expresión del daño muscular, lo

que ha llevado a ciertos autores a considerar a tales elevaciones, como un signo de sobreentrenamiento en este tipo de ejercicios. Sin embargo, hechos similares se pueden observar tras la realización de ejercicios agudos, y al finalizar el entrenamiento y la competición, en atletas que no sufren el síndrome de sobreentrenamiento (Bigard *et al.*, 2001).

En algunos atletas, sobre todo, en los que realizan carreras muy largas, suelen producirse lesiones musculares complicadas con insuficiencia renal, debido a que algunos productos derivados de la destrucción muscular (rabdomiolisis), lesionan el riñón. En otros, el ejercicio prolongado y especialmente las carreras pedestres, les origina hemorragias digestivas y la consecuente anemia ferropénica (Duncan *et al.*, 1987).

#### **4. MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR**

##### **4.1. GENERALIDADES**

Idealmente, un marcador bioquímico de daño músculo esquelético debe poder determinarse con una metodología simple, que permita su medida las 24 horas del día y que sea de tan rápida realización como la resonancia magnética o una ecografía. El marcador ideal debería ser músculo específico, su concentración intracelular alta, liberarse con rapidez en caso de lesión, mantener su concentración elevada durante un tiempo suficiente en la sangre y ser estable. En el suero de personas sanas este, marcador debería ser indetectable o bien encontrarse en una concentración muy baja que se diferencie claramente de su presencia al producirse daño en el órgano. Debería tener una elevada sensibilidad diagnóstica, especialmente en las primeras horas de la lesión y, finalmente, poseer una especificidad diagnóstica tan próxima al 100% como sea posible (los no lesionados o traumatizados deben poder ser reconocidos fiablemente) (Adams ,1993).

El diagnóstico biológico del daño musculares, se basa esencialmente en la medida de la actividad de los diferentes enzimas sarcoplasmáticos (quinasa, (CK) y lactato deshidrogenasa, (LDH) en el plasma. Estos enzimas son

normalmente estrictamente intracelulares, y el aumento de su actividad en el plasma refleja su fuga a través de estructuras membranosas (Kayashima *et al.*, 1995; Prou *et al.*, 1996). También puede buscar la presencia de productos de la peroxidación de membranas en el aire expirado (etano o pentano) o en el plasma (malondialdehído, MDA, o derivados del ácido triobarbitúrico, TBARs) (Leaf *et al.*, 1997). Con el fin de tener un mejor marcador de las lesiones musculares, se propuso medir la concentración plasmática de fragmentos de MHC de tipo I, pero por razones técnicas, se retiraron las herramientas necesarias del mercado para realizar este tipo de medida (Koller *et al.*, 1998). Se propuso también medir la concentración de la isoforma cardíaca de las subunidades I o T de la troponina en el plasma. Este tipo de medida no permite evaluar la presencia de isoformas musculares de proteínas contráctiles en el plasma, sino a lo sumo controlar que las proteínas detectadas no son de origen cardíaco (Bonetti *et al.*, 1996; Clarkson *et al.*, 1988).

Aunque la demostración directa de las lesiones musculares sea esencialmente histológica, en la práctica, son sobre todo las medidas de concentraciones plasmáticas de enzimas, donde sobrepasa el diagnóstico de dicho daño muscular sufrido. Recientemente, se preconizaron algunas medidas de resultado muscular y amplitud articular para evaluar el impacto funcional de las lesiones (Lynn *et al.*, 1998). La conjunción de distintos parámetros biológicos y clínicos debería, sin embargo, permitir apoyar el diagnóstico, como, por ejemplo, la asociación a un aumento de la actividad del LDH en el plasma, de la mioglobina, el MDA, el número de leucocitos y la alteración de los resultados musculares (Kayashima *et al.*, 1995).

#### **4.2. MARCADORES CLÁSICOS**

Las enzimas son proteínas responsables de catalizar las reacciones químicas en el organismo, y se encuentran en todos los tejidos. Se tratan de cadenas de aminoácidos con una secuencia específica, que determina su estructura tridimensional y es la que condiciona su actividad y especificidad sobre el sustrato. Se han detectado e identificado en el plasma o suero tras ser liberadas desde las células dañadas, o también desde células intactas

sometidas a estrés celular. En ambas situaciones, se ve aumentada la permeabilidad de la membrana. Estas enzimas intracelulares se difunden desde el territorio intersticial a través del drenaje linfático hacia la circulación general.

Las enzimas se han utilizado como marcadores musculares esqueléticos y cardiacos debido a que detectar su actividad catalítica fue el primer método analítico sensible del que se dispuso. Permitía de forma bastante sensible y selectiva su cuantificación, asumiendo que su actividad catalítica es proporcional a su concentración. De entre las enzimas estudiadas han demostrado ser útiles, más para el estudio del daño muscular cardiaco que para el estudio del daño muscular esquelético, sólo la lactato deshidrogenasa (LDH) y la creatin fosfoquinasa (CPK).

El diagnóstico, a través de marcadores, de las lesiones musculares vinculadas a la práctica del ejercicio, sigue siendo un gran problema de actualidad. La utilización de diferentes enzimas, como la CK en el plasma, no está vinculada a la severidad del ejercicio y a los dolores seculares, lo que indica que este es un marcador de baja especificidad y sensibilidad (Sorichter *et al.*, 1997).

La Unión Internacional de Bioquímica recomendó en 1.964 una nomenclatura para las enzimas, basada en la reacción que catalizan. En 1.973, apareció una nueva edición ampliada de esta nomenclatura donde el nombre científico describe el tipo de reacción, el sustrato, la coenzima y el producto. Además las enzimas se designan mediante un número de cuatro cifras separadas por un punto y precedidas de las siglas EC (Enzyme Commission). El primer número define el grupo a la que pertenece por el tipo de reacción química que cataliza, existen seis tipos diferentes de reacciones. Los dos siguientes números indican el subgrupo y sub-subgrupo en el que se engloban. El último dígito es el asignado a esa enzima para identificarlo.

La actividad enzimática se mide en Unidades Internacionales por unidad de volumen (UI/mL, U/L...). Se define a la unidad internacional como la

cantidad de enzima que transforma un micromol de sustrato en un minuto en condiciones estándar previamente establecidas. En cada técnica analítica se define la unidad de actividad y sus unidades.

#### **4.2.1. Creatina-quinasa (CK)**

También conocida como ATP-Creatina-N-fosfotransferasa, cataliza la reacción reversible de ceder un fosfato a la creatina para formar creatina fosfato a partir de ATP.

La CK citoplasmática (no mitocondrial) existe en los tejidos en tres formas isoenzimáticas, denominadas respectivamente BB (CK1), MB (CK2) y MM (CK3). Proviene de la asociación de dos subunidades de unos 360 aminoácidos y un peso molecular de alrededor de 40.000 daltons (Lang, 1981). La subunidad (M), fue inicialmente aislada del músculo (Muscle) y la subunidad B, del cerebro (Brain) (Nanji, 1983). Las tres isoenzimas de la CK tienen localizaciones tisulares diferentes. En el músculo, la enzima es esencialmente de tipo MM, mientras que la forma BB predomina en los otros tejidos, en especial en el cerebro y en el tracto gastrointestinal (Takagi *et al.*, 2001). El híbrido MB, por su parte, se halla localizado esencialmente en el miocardio, donde representa alrededor del 20% de la actividad de la CK total (Tsong, 1976; Ingwall *et al.*, 1985). Ahora bien, la especificidad de órgano de la CK-MB no es absoluta. Así, se han encontrado tasas de CK-MB superiores al 5% de la CK total en el bazo y en la próstata.

En el músculo esquelético la cantidad de CK-MB varía en función de la naturaleza del músculo, generalmente es inferior al 1% de la CK total (psoas, por ejemplo), pero el contenido en CK-MB del diafragma sólo es dos a tres veces menor que el del miocardio. Aunque en escasa proporción, en el músculo esquelético (el 5% aproximadamente de la actividad CK es CK-MB) la CK-MB puede verse incrementada por condiciones fisiológicas (ejercicio intenso) o patológicas (miopatías genéticas o secundarias) (Ohman *et al.*, 1982; Adams *et al.*, 1993). Tanto la subunidad M como la B pueden formar complejos con las inmunoglobulinas para dar lugar a “Macro CK” o

“Macrocinasas” (Lee *et al.*, 1994) que migran electroforéticamente entre CK1 y CK2.

La macro CK tipo I es un complejo enzima inmunoglobulina, generalmente BB-IgG (Jones *et al.*, 1990). La macro CK tipo II es una forma oligomérica de la CK mitocondrial y probablemente constituye un fragmento de la membrana interna de las mitocondrias. En otras ocasiones se pueden observar formas mitocondriales de la CK nombradas como CK Mt. Las macrocinasas pueden producir valores de CK-MB compatibles con síndrome coronario agudo (SCA) en pacientes no afectados del mismo. Por medio de técnicas electroforéticas se han podido separar las isoenzimas de CK en sus distintas isoformas. A partir de la isoenzima MM se separan tres isoformas: MM1, MM2, MM3, mientras que a partir de la isoenzima MB se obtienen dos: MB1 y MB2.

#### **A. Determinación de la actividad total:**

La dosificación clásica de la creatinaquinasa en los medios biológicos sin separación o purificación previa, da una medición global de la actividad de la enzima (CK total) sea cual sea la forma, o formas isoenzimáticas presentes. Se basa en la medición indirecta de la velocidad de formación del ATP cuando la enzima está en contacto con la fosfocreatina y con el difosfato de adenosina (ADP).

La presencia de la adenilato-quinasa (AK) en la muestra biológica, genera también, en estas condiciones, ATP a partir del ADP, que se ha utilizado en la dosificación. Existe pues, una interferencia de la AK, sobre todo eritrocitaria (hemólisis) o muscular, en la dosificación de la CK, lo que conduce a una sobrestimación de ésta y a la obtención de un resultado falsamente positivo. Los reactivos comerciales contienen inhibidores, como el monofosfato de adenosina (AMP) o el pentafofosfato de diadenosina (A2P5), que reducen de forma importante la interferencia de la AK, sin llegar a suprimirla del todo.

**B. Interpretación de los resultados:**

El aumento de la actividad de CK es precoz, a partir de la segunda hora una vez finalizado el ejercicio. Sin embargo, la acumulación de CK en el plasma se acentúa en el tiempo y alcanza un máximo entre el quinto y el noveno día.

Después de la práctica de ejercicios isométricos, que se caracterizan por contracciones máximas, los niveles de Creatin-Kinasa en sangre aumentan después de 6 a 8 horas llegando a su máximo nivel en 24 horas. Con cifras menores de 1.000 mU/ml. Graves et al, en sus investigaciones encontró, que la creatin-Kinasa MB aumentaba un 50 % en individuos que realizaban contracciones isométricos máximas durante más de 20 minutos. Sin embargo, en la actualidad, no se ha determinado de forma concluyente si la Creatin-Kinasa MB encontrada después de ejercicios isométricos, tiene un origen muscular esquelético o miocárdico. Esta situación podría determinar un problema significativo, ya que muchas de las actividades recreacionales y laborales presentan ejercicios de alta intensidad que incluyen contracciones de tipo isométrico (Clarkson *et al.*, 1988).

En los ejercicios excéntricos donde se genera gran cantidad de fuerza, como cuando se bajan grandes pesos, el incremento de Creatin-Kinasa en el torrente sanguíneo es retardado. La actividad de esta enzima comienza a incrementarse al segundo día, después del ejercicio, alcanzando su nivel máximo entre el quinto y sexto día. Estos incrementos de creatin-Kinasa llegan a ser notables. Por ejemplo, ejercitando de forma excéntrica tan solo los flexores del antebrazo, que son pequeños músculos, el incremento de la Creatin-Kinasa puede alcanzar valores máximos hasta 10.000 mU/ml y valores promedio de 2.000 mU/ ml (Ebbeling *et al.*, 1989).

Actualmente no existe una razón clara que pueda explicar el lento incremento sanguíneo de la creatin-Kinasa después de ejercicios excéntricos de alta intensidad, sobre todo cuando se compara con el rápido incremento de dicha enzima que se evidencia en los ejercicios isométricos y de resistencia.

Posiblemente, en estos últimos, se produzca una mayor hipoxia en los músculos. La hipoxia, así como otros factores, son capaces de incrementar la permeabilidad de la membrana, permitiendo la salida de la creatin-Kinasa y otras proteínas musculares, durante o inmediatamente después del ejercicio físico (Evans *et al.*, 1991).

En contraste, la elevación de la creatin-Kinasa después de ejercicios excéntricos responde aparentemente a otro mecanismo de producción con una secuencia de eventos escalonados y lentos de activación de ciertas enzimas musculares, que llevan a la degradación progresiva de los componentes celulares. Una explicación alternativa, es de que la creatin-Kinasa deba entrar en el sistema linfático antes de ser liberada al torrente sanguíneo, y al existir una marcada acumulación de fluidos en los tejidos, en el área muscular se disminuye el drenaje linfático.

### **C. Isoformas de la CK:**

El uso de técnicas de separación de alta resolución ha permitido demostrar la heterogeneidad de las isoenzimas CK-MM y CK-MB, las cuales consisten en varias isoformas. A diferencia de las formas atípicas, como la macro-CK del tipo I (CK-BB ligada a una inmunoglobulina) y del tipo II (CK mitocondrial polimérica), que aparecen raras veces en el suero, las isoformas de la CK-MM y de la CK-MB forman parte del proceso normal de degradación de la enzima y aparecen en todas las muestras de suero humano, son el resultado de modificaciones postranscripcionales de las isoenzimas de la CK, que conservan la actividad catalítica de la enzima, pero difieren en su peso molecular y en otras propiedades fisicoquímicas (Stein *et al.*, 1989). Conservan la actividad catalítica del enzima pero difieren en su masa molecular y en otras propiedades fisicoquímicas (Stein *et al.*, 1983).

Las isoenzimas representan adaptaciones especializadas de las enzimas en diferentes células y tejidos. Las isoenzimas de la CK están constituidas por agrupaciones de monómeros. Como hemos comentado anteriormente existen tres isoenzimas de la CK, cada una compuesta de dos

monómeros, M y B, que se agrupan en dímeros, para constituir la enzima funcional. La CK-MM (homodímero del monómero M) se localiza sobre todo (el 95% del total de CK es CK-MM) en el músculo estriado esquelético, y la CK-MB (heterodímero de los monómeros M y B) abunda más en el miocardio (se ha descrito que hasta el 20% del total de CK en el miocardio enfermo es CK-MB, aunque esta proporción es menor en el miocardio sano) (Ingwall *et al.*, 1985).

Existe una tercera isoenzima, el homodímero del monómero B, la CK-BB, que se localiza preferentemente en el sistema nervioso central y el intestino (Nanji, 1983). De acuerdo con lo anterior, la CK-MB constituye la isoenzima más cardioespecífica de las que forman parte de la llamada CK total. No obstante, la CK-MB también se encuentra en una escasa proporción en el músculo esquelético y puede elevarse en determinadas condiciones fisiológicas o patológicas (Adams *et al.*, 1993) e, incluso, en determinadas enfermedades extramusculares, como algunas neoplasias (Tsung *et al.*, 1981). Por estos motivos, la presencia de un «ruido de fondo», fisiológico o patológico, extramiocárdico, de la actividad catalítica circulante de la CK-MB en el plasma de individuos sanos limita su valor semiológico en la evaluación de la necrosis miocárdica. Otra importante limitación al valor semiológico de la medida de CK-MB son las interferencias *in vivo* o *in vitro* de los métodos de medida de su actividad catalítica; como resultado de las mismas, esta actividad catalítica puede aumentar falsamente.

Tras la necrosis tisular, la CK-MM<sub>3</sub> y la CK-MB<sub>2</sub> son liberadas al plasma donde, por la acción de una carboxipeptidasa, son convertidas rápidamente la CK-MM<sub>3</sub> en CK-MM<sub>2</sub> y CK-MM<sub>1</sub> y la CK-MB<sub>2</sub> en CK-MB<sub>1</sub> (Perryman *et al.*, 1984). En condiciones normales, las isoformas tisulares de CK-MM<sub>3</sub> y CK-MB<sub>2</sub> están en equilibrio con las isoformas plasmáticas (CK-MM<sub>2</sub>-CK-MM<sub>1</sub> y CK-MB<sub>1</sub>) y la razón entre ellas (CK-MM<sub>3</sub>/CK-MM<sub>1</sub> y CK-MB<sub>2</sub>/CK-MB<sub>1</sub>) es próxima a 1,0. La conversión de las isoformas tisulares en isoformas plasmáticas es más rápida para CK-MB<sub>2</sub> que para CK-MM<sub>3</sub> (Figura 15).

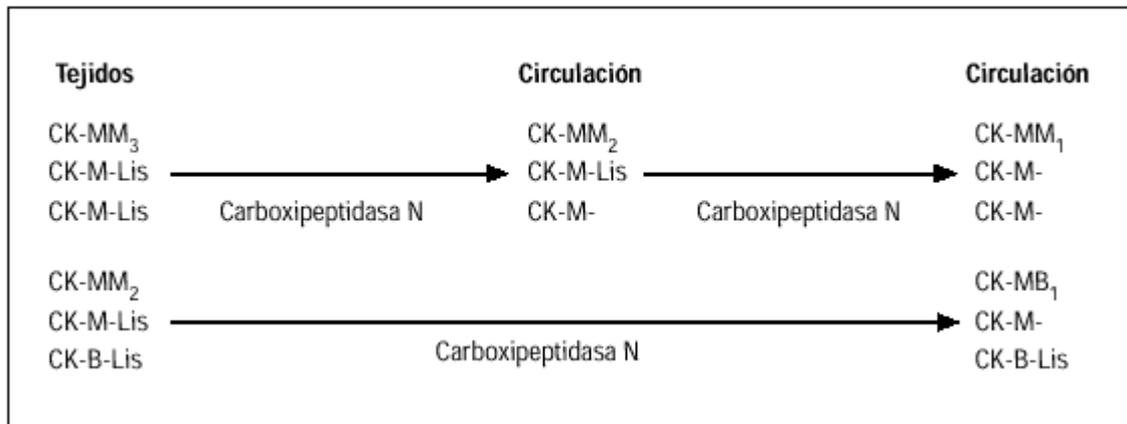


FIGURA 15. GENERACIÓN DE ISOFORMAS CK-MM Y CK-MB *IN VIVO*.

#### 4.2.2. Láctico deshidrogenasa (LDH).

La lactato-deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), enzima que cataliza la oxidación del L-lactato en piruvato, mediante la oxidación de NADH a NAD, se halla presente en la mayoría de los tejidos humanos, sobre todo en miocardio, riñón, hígado y músculo. De un peso molecular de 134.000 dalton, la LDH está constituida por la formación de un tetrámero, a partir de dos cadenas peptídicas, M ("Muscle", músculo) y H ("Heart", corazón).

Según Rasmussen, et al, (2002) la LDH es una enzima citoplasmática, contrariamente a lo que publican diversos autores (Brandt *et al.*, 1987; Brooks *et al.*, 1999), que afirmaban de la existencia de un LDH mitocondrial en músculo.

Existen, pues, 5 isoenzimas distintos, con leves diferencias en su estructura, que sugieren diferentes orígenes por cada tejido:

- La LDH1 del corazón, músculos, y hematíes
- La LDH2 del sistema retículo endotelial y leucocitos
- La LDH3 de los pulmones
- La LDH4 de los riñones, placenta y páncreas.
- La LDH5 del hígado y músculo

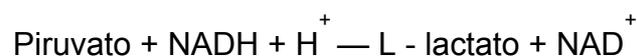
La proporción de las isoenzimas varía de un tejido a otro. En el corazón predomina la isoenzima LDH1 (del 35 al 70% de la actividad LDH total). En el hígado, en cambio, es mayoritaria la isoenzima LDH5 (30-85%). Los eritrocitos son ricos en LDH1 y LDH2. Los monómeros H y M difieren significativamente en su composición de aminoácidos, y por ello en su estructura y propiedades cinéticas, probablemente estén codificados por dos genes diferentes.

En general, aquellos tejidos que desarrollan un metabolismo aeróbico presentan mayor concentración de subunidades H (LDH1 y 2) la subunidad H presenta una mayor afinidad por el lactato que por el piruvato, al contrario que la subunidad M. Aquellas isoenzimas con mayor contenido en H producen aumento en la concentración de piruvato que se convierte en acetil CoA (vía de la piruvato decarboxilasa), que es introducido en el ciclo de Krebs para generar altas concentraciones de ATP. En el caso del miocardio, que necesita de un suministro constante de energía, las isoformas LDH1 y LDH2 son las formas predominantes. El estudio de estos patrones de distribución permiten identificar lesiones tisulares concretas. En el músculo cardíaco la relación LDH1/LDH2 suele ser inferior a 1, generalmente ente 0.5 y 0.75.

#### **A. Determinación de la actividad total:**

Las coenzimas reducidas de las deshidrogenasas (NADH, H<sup>+</sup> y su derivado fosforilado, la NADPH, H<sup>+</sup>) presentan un pico de absorción a 340 nm, que desaparece cuando están oxidadas. La conversión de la forma oxidada en forma reducida, o viceversa, es fácil de seguir gracias a la simple medición de la absorbancia a 340 nm.

El principio se utiliza para medir la lactato-deshidrogenasa, que cataliza la siguiente reacción:



Por regla general, el sentido piruvato-lactato se emplea porque permite la velocidad de reacción más elevada. Para esa reacción se trabaja con un pH

de 7,4, y en tales condiciones, el pH óptimo de las diversas isoenzimas de la LDH es casi idéntico (Figura 16).

Niveles normales de LDH en adultos	115 a 225 UI/L
Niveles de LDH-1	del 17 al 27 %
Niveles de LDH-2	del 27 al 37 %
Niveles de LDH-3	del 18 al 25 %
Niveles de LDH-4	del 3 al 8 %
Niveles de LDH-5	del 0 al 5 %

FIGURA 16. VALORES NORMALES DE LDH EN SUERO

### **B. Interpretación de los resultados**

En realidad, dada su amplia distribución, puede elevarse por multitud de causas, fundamentalmente por destrucciones titulares. La determinación de sus isoenzimas ayudará a conocer el origen de su elevación. Podemos destacar su elevación en miopatías, infarto de miocardio, infarto pulmonar, hemopatías y hemólisis, accidentes vasculares cerebrales y enfermedades sistémicas (panarteritis nodosa, dermatomiositis, poliomiocitis) y en el cáncer diseminado.

En el infarto agudo de miocardio, empieza a elevarse entre 12-24 horas, con un ascenso máximo a los 2-4 días (son frecuentes valores entre 1.500 a 2.500 unidades) para retornar a los valores normales entre los 8-14 días (Figura 16). En la hepatitis aguda son habituales ascensos entre 5-10 veces los valores normales.

Para el diagnóstico diferencial de una necrosis miocárdica, valoraremos elevaciones de la fracción LDH1 (alfa-HLDH) superiores al 33% (habitualmente entre 50-70 % del total en el infarto de miocardio), con valores absolutos de LDH1 superiores a 140 U/l y un coeficiente LDH1/LDH > 0,5.

La determinación del contenido en LDH en el líquido de un derrame, ayuda a diferenciar un exudado de un trasudado, ya que en los primeros es superior a un 60 % del valor de LDH en plasma.

#### **4.3. EVOLUCIÓN DE LOS DISTINTOS MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR.**

La ausencia de un marcador simple, sensible y reproducible de lesiones musculares plantea un problema importante para la estimación de la gravedad del daño sufrido. Como eso se demostró en animales, no existe relación entre la actividad de enzimas sarcoplasmicas en el plasma y el alcance de las lesiones histológicas (Van der Meulen *et al.*, 1991). Experimentos en animales sujetos a ejercicios al curso sobre alfombra rodante, se puso de manifiesto que el alcance de las lesiones musculares aumentaba con la duración del curso. Sin embargo, este aumento no es proporcional con el tiempo; además, el alcance de las lesiones evaluado por la actividad del CK, del LDH o de la aminotransferasa plasmática es siempre mucho más importante que la gravedad evaluada de manera directa por histología (Evans *et al.*, 1991). Se aportaron otras pruebas experimentales en el animal utilizando la actividad del  $\beta$ -glucoranidasa como marcador de lesiones musculares.

Utilizando la CK como marcador orgánico, se puso de manifiesto que incluso en las situaciones de ejercicio que no implicaban ningún daño muscular, como la natación en la rata, se observaba un aumento de la actividad plasmática de la misma CK (Komulainen *et al.*, 1995). Al revés, y contrariamente a lo que se esperaba, el curso en pendiente inducido en el animal, produciendo un aumento mucho más escaso de la actividad del CK en el plasma que la natación. Todos estos resultados lanzan una duda sobre la especificidad y la sensibilidad de la actividad plasmática del CK. Aunque muy ampliamente utilizada, la medida de la actividad de las enzimas sarcoplasmicas en el plasma como el CK o el LDH representa un mal factor pronóstico de la gravedad de las lesiones musculares inducidas por el ejercicio y del estado de decaimiento celular. No existe estrecha correlación entre lesiones musculares histológicamente visibles y liberación de las enzimas sarcoplasmicas en el plasma.

#### 4.4. NUEVOS MARCADORES

Aunque tanto las metodologías para medir la actividad total de CK cumplen los requerimientos analíticos, no presentan la eficiencia diagnóstica ideal para el diagnóstico del daño muscular esquelético producido por el ejercicio.

La medida de actividad de CK se ha considerado tradicionalmente como el marcador bioquímico de daño cardíaco de entre los conocidos. Sin embargo, la mayor parte de metodologías utilizadas para medir actividad CK presentan diversas fuentes de inespecificidad como interferencias por otras cinasas (p.e. la adenilato cinasa, cuya concentración catalítica en el plasma aumenta por la hemólisis), por isoenzimas de CK (CKMM o CK mitocondrial) o, finalmente, por los complejos CK-inmunoglobulinas conocidos como macrocinasas. Al coexpresarse tanto en el músculo esquelético como en el miocardio, existen incrementos de CKMM actividad en suero o plasma originados por alteraciones musculares en ausencia de signos de daño muscular con los métodos de imagen más eficientes. Por lo tanto, actualmente no puede considerarse a la medida de CK actividad como el mejor criterio bioquímico para el diagnóstico de daño muscular esquelético.

Con la introducción de la biología molecular en el terreno de la actividad física y con el desarrollo de la biotecnología, se está avanzando muy positivamente en el campo de los marcadores de daño muscular. El impulso tecnológico y conceptual que han representado los anticuerpos monoclonales ha aportado una poderosa y valiosísima herramienta diagnóstica.

##### 4.4.1. *Troponinas*

Los filamentos delgados del músculo estriado, además de estar formados por actina, contienen dos proteínas principales accesorias, que ejercen una función reguladora, controlando la construcción y la ruptura de los puentes transversales entre los filamentos gruesos y delgados, así como la producción de energía mecánica. Una de ellas es la **Troponina**, una proteína reguladora importante, globular de gran tamaño, descubierta por el bioquímico

japonés S. Ebashi y sus colaboradores en 1965. Tiene un peso molecular de 78,000 daltons.

La troponina contiene tres subunidades polipeptídicas (TnC, I, T), cada una de las cuales tiene una función específica. La subunidad fijadora de  $\text{Ca}^{++}$  de la troponina es la **TnC**, tiene un peso molecular de 18,000 daltons. Cada molécula de TnC enlaza fuertemente a dos iones  $\text{Ca}^{++}$ , y simultáneamente experimenta un cambio de conformación.

La subunidad inhibidora de la troponina es la **TnI**, tiene un peso molecular de 23,000 daltons y posee un centro de unión específico para la actina; su función consiste en inhibir la interacción de la actina con los puentes cruzados de la cabeza de la miosina. La subunidad TnI es fosforilada por la fosforilasa-quinasa, que normalmente activa a la fosforilasa b, transformándola en la fosforilasa a, activa.

El tercer componente de la troponina, **TnT**, es la subunidad fijadora de tropomiosina, tiene un peso molecular de 37,000 daltons. La molécula completa de la troponina tiene forma globular y contiene a una de las subunidades TnC, TnI y TnT. (Figura 17).

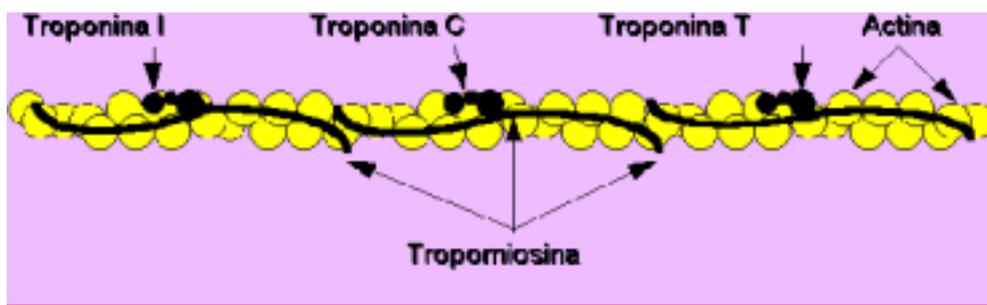


FIGURA 17. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL FILAMENTO DELGADO DE LAS MIOFIBRILLAS DEL MÚSCULO ESTRIADO

La liberación de **Troponina T (TnT)** es típicamente bifásica: el primer pico aparece en el 50% de los pacientes a las 4 horas ( CK sólo el 25%), máxima a las 12-24 horas. Ésta primera oleada, se corresponde con la liberación del complejo terciario por daño de las miofibrillas, que posteriormente

se degrada a complejo proteína C-cTnI + cTnT libre, junto con la cTnT liberada del pool citosólico; y un segundo pico el el día cuatro, sobre todo en los pacientes que han sido reperfundidos (Mair *et al.*, 1994).

La presencia de cTnT en plasma no es específica para el diagnóstico de cardiopatía isquémica, sino que se libera en casos de insuficiencia cardíaca (IC) (por lesión de los miocitos). Por el contrario, hay estudios hechos en cerdos bajo remodelación ventrículo izquierdo (VI) importante tras un IAM, en los que los valores de cTnI y cTnT están disminuidos entre un 40-80% de lo normal, debido a una pérdida crónica de troponinas en un miocardio dañado en el que no hay suficiente capacidad de re-exresar los genes que aumentarían la síntesis proteica (Wilkinson *et al.*, 1978).

Su vida media es de 120 minutos, pero puede detectarse proteína circulante hasta 21 días después de un daño muscular debido a la degradación de las miofibrillas (hasta una semana más que la CK). Presenta una especificidad de órgano muy alta, por lo que una elevación de su concentración en sangre indica claramente necrosis de células miocárdicas. Por lo tanto es un marcador de daño miocárdico.

Cada molécula de troponina está fijada al filamento delgado por dos centros de unión, uno de ellos específico de una hebra de actina, y el otro específico para una hebra de tropomiosina. La unión a la tropomiosina, parece que tiene lugar en un punto fijo, pero la unión al filamento de actina experimenta su formación y ruptura dependiendo de la unión de  $Ca^{++}$ . A lo largo de un filamento delgado, se encuentra una molécula de troponina cada 40 nm, así que por cada siete monómeros de actina G, existe una molécula de tropomiosina y otra de troponina.

Cuando se da algún daño en el tejido muscular, es cuando se podrían encontrar en el torrente sanguíneo alguno de los componentes proteicos que tienen que ver con el proceso de contracción- relajación. Las troponinas son marcadores bioquímicos que pueden ser utilizadas para la detección de daño celular. Las subunidades T, C e I de la troponina son proteínas del aparato

contráctil, que se presentan en diversas isoformas, dependiendo del músculo específico de que provengan. La determinación de estas sustancias junto con otros marcadores bioquímicos abre nuevas posibilidades diagnósticas en diversas patologías, en especial en el infarto agudo del miocardio.

El valor diagnóstico de la troponina ha sido ampliamente discutido en tiempos recientes. La determinación que se mantuvo en boga por cierto tiempo fue la medición de la troponina T (TnT). Sin embargo, recientemente se ha insistido en que es la troponina I (TnI) la que posee mayor sensibilidad y eficiencia para el diagnóstico de diferentes daño musculares (daño cardíaco y daño músculo esquelético). Las referencias que existen al respecto son numerosas y se han descrito comparaciones con otros parámetros: las isoenzimas de deshidrogenasa láctica (LDH), creatina kinasa (CK) y sus isoenzimas como la CK-MB, mioglobina e incluso con la misma TnT. Con estas comparaciones se ha llegado a la conclusión de que es la TnI es la mejor opción para el diagnóstico de dichos daños musculares (Stephan Sorichter *et al.*, 1997).

#### **A. Isoformas de la Troponina I como marcadores de daño muscular:**

Se ha sugerido el uso de anticuerpos que reconozcan en conjunto a la TnI junto con las otras dos subunidades, ya que se ha descrito que la TnI se libera al torrente sanguíneo, en algunas ocasiones libre y en otras formando complejos con las otras subunidades tropónicas. Existen únicamente tres isoformas de TnI: la del músculo esquelético rápido (rTnI), la del músculo esquelético lento (sTnI), y la del músculo cardíaco (cTnI) (Wilkinson *et al.*, 1978). Las tres isoformas están codificadas por genes diferentes y tienen una variación del 40% en sus secuencias de aminoácidos. La cTnI tiene un residuo adicional de aminoácido en su extremo N-terminal (Mair *et al.*, 1992).

Asimismo, se ha demostrado que el músculo esquelético no expresa **cTnI** ni durante su fase de desarrollo, ni como respuesta a estímulos. Por consiguiente, la cardioespecificidad absoluta de la cTnI permite distinguir entre lesiones cardíacas y lesiones esqueléticas, y permite el diagnóstico de infarto

de miocardio diferente de lesiones musculares (rabdiomiólisis, politraumatismo) y la cirugía no cardíaca. También se han demostrado niveles elevados de troponina I en casos de angina inestable e hidropesía cardíaca. La cTnI es 13 veces más abundante en el miocardio que la CK-MB y normalmente no circula en la sangre, por lo que la señal de tasa de ruido es más favorable para la detección de necrosis miocárdica. Los datos acumulados a partir de diversos estudios indican que los niveles de troponina I son detectables (por encima de los datos indicados para muestras no-IAM) transcurridas 3–6 horas desde la aparición del dolor de pecho. El reconocimiento diferencial de las formas de cTnI, en su forma libre o acomplejada, es común en la mayoría de los métodos comerciales. En algunos ensayos las respuestas relativas a las diversas formas de cTnI son prácticamente equivalentes, mientras que en otros ensayos muestran una diferencia sustancial.

La **isoforma sTnI** tiene especificidad absoluta de músculo esquelético, con una ventana amplia de diagnóstico, que permite un diagnóstico temprano (de 2 a 6 horas), y también después de 24 a 48 horas, y por último una alta sensibilidad con una gran magnitud de respuesta.

Diferentes estudios evalúan la respuesta de la sTnI y se comparan con su concentración a lo largo del tiempo con la CK, la MB y MHC en muestras seriadas de sangre de diferentes grupos de atletas (Gunst *et al.*, 1998). En general hay un aumento relativo mayor en la sTnI sobre los valores basales comparados con los otros marcadores estudiados. Los niveles más altos de liberación que se presentan en la MB, se consiguen antes (media 2 horas), seguida de la sTnI (media 6 horas), la CK (de media un día) y la MHC (de media 2 días). Los resultados de este estudio prueban la evidencia de que un esfuerzo muscular alto, asociado con la concentración excéntrica o cambios longitudinales, que ocurren durante la concentración excéntrica, causan una rápida disociación y o degradación con una rápida eliminación de sTnI.

En la isoforma sTnI se detecta un aumento a las 2 a 6 horas después del inicio del ejercicio, que origina el daño muscular, con una mayor respuesta si se trata de un ejercicio excéntrico (Gunst *et al.*, 1998). La sTnI tiene un

amplio rango como marcador inicial, con un tope a las 24 horas y permaneciendo elevada por lo menos uno o dos días. En contraste con todos los demás marcadores disponibles la sTnI es una proteína única en músculo esquelético. Aumenta rápidamente en plasma, particularmente su pico más alto en un corto tiempo indica alteraciones del filamento fino de la troponina, después de daño muscular inducido por el ejercicio.

Finalmente, aunque se recomienda el uso de la TnT como prueba diagnóstica, la evaluación de la CK-MB y la mioglobina son otros parámetros útiles, en especial para la determinación de la fase de daño y la toma de decisión terapéutica. Para la determinación de daño muscular, la TnT aparece primero que la TnI, pero aquella presenta la limitación de no ser tan específica como la última.

#### **4.4.2. Cadenas de miosina**

La miosina es otra proteína miofibrilar que interacciona reversiblemente con la Actina durante la contracción muscular. Está constituida por una cadena pesada con dos cadenas ligeras en cada extremo. Existen dos tipos de cadenas ligeras: las cadenas ligeras de tipo 1, que tienen una masa molecular relativa de 29.000 Da, y las cadenas ligeras de tipo 2, que tienen una masa molecular relativa de 24.000 Da. Las moléculas de cadenas ligeras de miosina de tipo 1 y de tipo 2 existen en varias formas (isoformas) que difieren por la composición en aminoácidos. Sin embargo, no se conocen isoformas específicas en el miocardio. Se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales para reconocer diferentes epítomos de la cadena ligera de la miosina (Weeds *et al.*, 1971). La cadena pesada de miosina tipo  $\beta$  ( $\beta$ -MHC) es la predominante en humanos con miocardio sano y dañado. Junto con las cadenas ligeras de miosina, la  $\beta$ -MHC, forma la miosina, que es la mayor proteína estructural del miocardio. La  $\beta$ -MHC también se expresan en las fibras musculares esqueléticas, por lo tanto no son cardioespecíficas (Harrington *et al.*, 1984). Se ha sugerido que podría ser útil para la detección del daño miocárdico menor (Hoberg *et al.*, 1987) y para identificar pacientes con

enfermedad coronaria severa y determinar su pronóstico (Katus *et al.*, 1988; Ravkilde *et al.*, 1995).

#### **4.4.3. Mioglobina**

La Mioglobina es una hemo proteína monomérica de 153 aminoácidos, que se encuentra principalmente en las células del músculo estriado (músculo esquelético y cardíaco). Su concentración representa el 2% de las proteínas totales del músculo, y su función es transportar y almacenar oxígeno en la célula. Se une reversiblemente al oxígeno, aumentando su transporte a la mitocondria, y juega un papel importante en el metabolismo aeróbico de la célula. Una pequeña parte está ligada a elementos estructurales de las células musculares, y el resto está localizada en el citoplasma. No presenta especificidad miocárdica. Tras necrosis tisular, la Mioglobina es liberada por las células musculares y aparece en la circulación sanguínea y en la orina. Su principal ventaja radica en la rapidez de su elevación en la sangre.

La Mioglobina es el marcador biológico más precoz de la necrosis miocárdica. Su peso molecular (17.800 Da) le permite una rápida difusión, más rápida que otras moléculas de mayor peso como CK (80.000) o LDH (130.000). La Mioglobina aparece en sangre periférica 2 ó 3 horas después del inicio del dolor y alcanza niveles patológicos 3–6 horas antes que la CK-MB. El nivel de máxima concentración se alcanza en unas 6–9 h, mientras que otros marcadores cardíacos lo hacen en unas 12–19 h. Su eliminación es por vía renal (Gibler *et al.*, 1987; Ohman *et al.*, 1990; Mair, 1997).

## **5. IMPORTANCIA DE LA ACTINA EN LA FIBRA MUSCULAR**

### **5.1. GENERALIDADES**

La actina es una de las dos mayores proteínas del músculo, y puede llegar a representar más del 20 % del total de proteínas celulares (Korn, 1982; Aránega *et al.*, 1990). Además de ser una de las proteínas más abundantes en la naturaleza, la actina es también una de las proteínas más conservadas

(Hirano *et al.*, 1987). Tanto su presencia generalizada, como su estabilidad evolutiva, sugieren la importancia biológica fundamental de la actina.

La actina es el mayor componente de los filamentos delgados del músculo. Puede aislarse tratando polvo seco de músculo con soluciones salinas muy diluidas. Este tratamiento disgrega los filamentos de actina en sus subunidades globulares, las cuales están compuestas por un único polipéptido de 43 KD de peso molecular (Korn, 1982), conocido como actina globular o actina G. Cada molécula de actina G está íntimamente asociada a un  $\text{Ca}^{2+}$ , que estabiliza su configuración globular, y también a una molécula de ATP, a través de su enlace no covalente (Alberts *et al.*, 1986).

## 5.2. POLIMERACIÓN

Monomérica o de baja fuerza iónica, la actina G polimeriza a través de un enlace reversible no covalente, en filamentos de actina filamentosa o actina F que contiene miles de protómeros (Grazi *et al.*, 1986), cuando las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  o las fuerzas iónicas llegan a niveles fisiológicos (Oosawa *et al.*, 1971). Después de la polimerización continúan adiciones y pérdidas de monómeros en los extremos de los filamentos hasta alcanzar un estado estable. El filamento de actina está polarizado, y es fácilmente demostrable, con imágenes de microscopio electrónico, la presencia de estos filamentos juntos a los de miosina, los cuales en ausencia de adenosín-trifosfato (ATP), se liga a la actina F con un ángulo de 45 grados (Moore *et al.*, 1970).

Solo es conocida la actuación de la actina polimérica, y la estudiada con más interés, ha sido la actina que compone los filamentos delgados del músculo estriado, la cual, junto con los filamentos gruesos de miosina, proporcionan el mecanismo químico necesario para la contracción (Eisenberg, 1985). La contracción muscular es una de las manifestaciones más evidentes del rol que juegan los microfilamentos de actina F en la motilidad de todas las células eucariotas. La locomoción celular, la citoquinesis, fagocitosis y retracción de las plaquetas son unos pocos ejemplos de las actividades

mecánicas actomiosín dependientes de las células no musculares, que son fundamentalmente similares a la contracción muscular (Korn, 1982).

En el músculo, el proceso de polimerización es importante sólo para proporcionar y mantener los filamentos delgados necesarios para la actividad contráctil. Aunque el estado de organización de la actina en las células está muy influenciado por las interacciones de actina G y actina F con otras proteínas (Pollard, 1986), la polimerización es una propiedad de la actina sola. Por esto es esencial entender el mecanismo de polimerización de la actina para orden de comprender la dinámica de los complejos sistemas de los microfilamentos.

Ya hemos mencionado que los monómeros de actina-G están ligados a una molécula de ATP por un enlace no covalente. Este es hidrolizado a actina-F adenosín difosfato (ADP), y fósforo inorgánico libre (Pi), durante la polimerización, en un proceso que envuelve la formación transitoria de actina-F + Pi (Carlier, 1987). El ATP no es resintetizado cuando se despolimeriza la actina-F, pero el ADP unido a la actina-G, que es disociada desde el extremo del filamento, se intercambia por ATP en solución y se regenera la actina-G-ATP. Así, la polimerización y despolimerización da como resultado una continua hidrólisis del ATP, y por lo tanto, se puede considerar a la actina como una adenosintrifosfatasa (ATPasa) (Korn, 1982).

En contraste con otros polímeros biológicos, la función de los miofilamentos requiere espacial y temporalmente una regulada depolimerización así como polimerización. Los nucleosidos trifosfatos hacen la función de reguladores para esta interconversión de monómeros a polímeros.

La división del ATP es totalmente paralela a la formación de actina-F. En una fase temprana de la polimerización, se divide una molécula de ATP en el oligómero, formando una interfase entre ATP-actina y una subunidad de ADP.Pi-actina. Esta interfase llega a ser el lugar preferente para la hidrólisis, al menos en un extremo de los filamentos. A grandes concentraciones de monómeros de actina la elongación es más rápida que la hidrólisis del ATP en

el filamento. El proceso de polimerización sucede de tal manera que, al caer la concentración de monómeros, la elongación del filamento es menor que la hidrólisis del ATP. Así los segmentos de ATP-actina y ADP-Pi-actina llegan a ambos extremos del filamento. Cuando la concentración de monómeros se aproxime a su concentración crítica, las subunidades de ATP-actina desaparecen.

Como resultado de la hidrólisis del ATP, la concentración crítica de ATP de uno de los extremos del filamento es más baja que en el otro extremo y esto podría dar lugar a despolimerizaciones parciales del filamento. Aunque la despolimerización podría ser menor en presencia de Pi, el cual se ligaría a las subunidades de actina-F dando lugar a la formación de ADP.Pi-actina. Esto reduciría, pero no eliminaría, las diferencias en las concentraciones críticas de ATP en los dos extremos del filamento. Así la división del ATP y los niveles de Pi que acompañan a la polimerización de la actina y las subunidades de ADP.Pi-actina en uno de los extremos del filamento proporcionan varios mecanismos potenciales de regulación de la dinámica de los microfilamentos en las células musculares (Korn *et al.*, 1987).

### 5.3. ESTRUCTURA

En cuanto a la estructura en sí de la proteína analizada al microscopio electrónico, la actina F tiene la apariencia de una doble cadena enrollada en hélice hacia la derecha y con entrecruzamientos cada 36 nm. Pioneros en el estudio de los filamentos de actina fueron los trabajos de Hanson (Hanson, 1967) que estudió los paracristales de actina porque estos están extremadamente bien ordenados y son fácilmente observables en análisis de imagen. El objeto de estudio fue un paracristal inducido por una gran concentración de Mg<sup>2+</sup>. Son muchos los grupos que han trabajado en orden de determinar la estructura tridimensional de la actina y de la actina junto a la tropomiosina. En sus reconstrucciones, los filamentos de actina tienen de 7 a 8 nm. de ancho (Wakabayashi *et al.*, 1975).

Sin embargo datos obtenidos por difracción de rayos X para conseguir imágenes de actina F, han sido interpretados indicando una cadena simple enrollada en hélice hacia la izquierda, con alguna controversia acerca de la orientación de sus subunidades (Egelman, 1985; Egelman *et al.*, 1984).

Fowler y Aebi (Fowler, 1983) hablan de un modelo de filamentos de actina cuyo diámetro es 7 a 8 nm., y en el que las subunidades globulares llevan un ordenamiento paralelo al eje longitudinal del filamento. Egelman y Padrón (Egelman *et al.*, 1984) establecen un modelo en el cual el diámetro de los filamentos de actina es de 9.5 nm., y las subunidades globulares estarían ordenadas perpendicularmente el eje longitudinal del filamento.

El modelo ideal de los filamentos de actina consiste en subunidades idénticas equivalentemente ordenadas en un enrejado helicoidal. Este enrejado determina la simetría de los filamentos.

Así la simetría de un filamento ideal viene determinada por dos parámetros, la altura espacial por subunidad (2.73 nm) y el ángulo entre subunidades (167 grados). Por último diferentes estudios afirman que las diferencias entre los ángulos formados entre las subunidades de actina, en diferentes filamentos, es pequeña, y que puede variar en un mismo filamento en condiciones diferentes (DeRosier *et al.*, 1984).

Se han realizado múltiples esfuerzos para conocer de manera más detallada la estructura atómica de la actina (Kabsch *et al.*, 1990; Colmes *et al.*, 1990). Unos de los más importantes estudios en este sentido ha sido realizado por Milligan (Milligan *et al.*, 1990) usando microscopía electrónica y métodos de procesamiento de imágenes helicoidales para calcular mapas tridimensionales de la actina-F. Sus resultados corroboran que el eje mayor de los monómeros se ubica más o menos a lo largo de la helice del filamento y que este tiene un máximo de diámetros de 95-100 Å. Identifican en los monómeros un dominio interno y otro externo situados alrededor de los 26 y 17 Å respectivamente del filamento axial y localizan dos conexiones entre los monómeros, una

longitudinal entre los dominios internos de monómeros adyacentes y otra diagonal entre el dominio interno y el externo y ambas se encuentran alrededor de 20 Å de filamento axial. Estos autores también localizan, en la molécula de actina, los sitios de unión a la tropomiosina y cabezas de miosina. Así demuestran que, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y de cabezas de miosina, la tropomiosina se encuentra en el dominio interno de la actina cerrando los contactos de la hélice, y que el lugar de mayor unión con la miosina se encuentra localizado en la porción inferior de la cara frontal del dominio externo y parece extenderse, a través del dominio interno, cerca del lugar de unión con la tropomiosina.

#### 5.4. ISOFORMAS

En los grandes vertebrados la proteína citoesquelética actina existe en seis isoformas diferentes, las cuales han sido codificadas por genes separados (Firtel, 1981). Estos genes se expresan con patrones específicos en cada tejido: dos isoformas predominantes en células no musculares ( $\beta$  y  $\gamma$  no musculares), dos en las células musculares lisas ( $\alpha$  y  $\gamma$  de músculo liso), una en músculo cardíaco ( $\alpha$  cardíaca) y una en el músculo esquelético ( $\alpha$  esquelética). La complejidad en la expresión de las diferentes isoformas ha dado lugar a múltiples sugerencias sobre las posibles diferencias funcionales de la actina (Bravo *et al.*, 1981; Korn, 1982).

La miogénesis, durante la cual las células exhiben grandes cambios en la expresión de las isoformas, es un modelo muy utilizado para la localización de las isoformas (Minty *et al.*, 1982; Vankerckhove *et al.*, 1986). Métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos han sido usadas para determinar si la actina muscular y no muscular se encuentra dentro de diferentes localizaciones musculares durante la miogénesis (Lin *et al.*, 1986). Lubit y Schwartz (Lubit *et al.*, 1980) usaron un anticuerpo específico para las isoformas no musculares de la actina, y observaron que no marcaba la actina de los microfilamentos de la banda I de las fibras musculares. Pardo y cols. (Pardo *et al.*, 1983) usaron un anticuerpo, que reaccionaba con la isoforma  $\gamma$  actina ( $\gamma$ -no muscular y  $\gamma$ -músculo liso), en secciones congeladas de diafragma de ratón. Este anticuerpo

marcaba la periferia de la mitocondria, pero no marcaba las bandas I del aparato contráctil muscular. Fatigati y Murphy (Fatigati *et al.*, 1984) analizaron las isoformas  $\alpha$ -musculo liso,  $\beta$ -no muscular,  $\gamma$ -musculo liso y  $\gamma$ -no muscular en 15 diferentes músculos lisos, y observaron una gran proporción de la isoforma  $\alpha$ -musculo liso en tejidos que tenían un alto grado de tono muscular, y esta isoforma desaparecía en células en cultivo al tiempo que se modificaba el fenotipo de célula contráctil a célula proliferativa. Otey y cols. (Otey *et al.*, 1988) consiguieron un anticuerpo que reconoce solo la isoforma  $\alpha$ -esquelética de la actina.

DeCouet y Weber (DeCouet *et al.*, 1983), analizaron la secuencia de aminoácidos de actina de mamíferos y aves, concluyeron que un ancestral gen de la actina muscular, expresados en vertebrados inferiores, se duplicó antes o durante una fase temprana de la evolución, resultando un gen de actina de músculo liso y un gen de actina de músculo estriado. Una segunda duplicación puede haber dado lugar a genes de actina estriada cardíaca, genes de actina estriada esquelética, genes de actina de músculo liso vascular y genes de actina de músculo liso no vascular. Hightower y Meagher (Hightower *et al.*, 1986), compararon nucleótidos y secuencias de aminoácidos de 20 genes de actina, y observaron que comparando las secuencias que había entre los diferentes genes de actina muscular y de actina citoplasmática en grades vertebrados había menos de un 3 % de divergencia.

La Actina F tiene la apariencia de una doble cadena enrollada en hélice hacia la derecha y con entrecruzamientos cada 36 nm. (Figura 18)

En la actualidad se han descrito 183 secuencias diferentes para la Actina que están disponibles en la base de datos SwissProt. En los grandes vertebrados la proteína citoesquelética Actina existe en seis isoformas diferentes, las cuales han sido codificadas por genes separados (Firtel, 1981). Estos genes se expresan con patrones específicos en cada tejido:  $\alpha$  (músculo cardíaco),  $\alpha_1$  (músculo esquelético),  $\alpha_2$  (músculo liso vascular),  $\alpha_3$  (músculo liso intestinal),  $\beta$  (citoplasmática) y  $\gamma$  (citoplasmática). (Sheterline *et al.*, 1998).

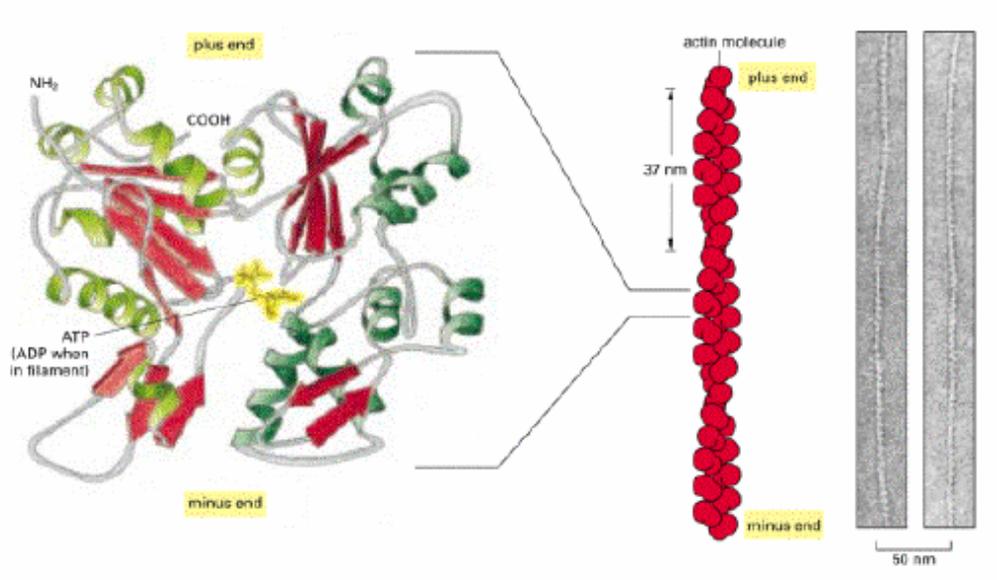


FIGURA 18. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ACTINA G Y ACTINA F.

La  $\alpha$  Actina en humanos es idéntica a la del ratón (*Mus musculus*) y el pollo (*Gallus gallus*) (Hamada *et al.*, 1982; Alonso, 1987; Chang *et al.*, 1985).

La  $\alpha$  Actina difiere de la  $\alpha 1$  Actina en 4 aminoácidos y de la  $\alpha 2$  Actina y  $\alpha 3$  Actina en 5. Mayor heterogenicidad se encuentra entre la  $\alpha$  Actina y la  $\beta$  Actina que se diferencia en 22 residuos y con la  $\gamma$  Actina en 21. (Von Arx *et al.*, 1995)

## 5.5. UTILIZACIÓN DE LA ALFA ACTINA EN DAÑO MUSCULAR CARDIACO.

La  $\alpha$ -Actina es una de las proteínas más abundantes presentes en el aparato contráctil de las fibras musculares cardíacas. Representa más del 20% del total de proteína en la sarcómera (Korn, 1982; Aránega *et al.*, 1991). Es el componente más importante de los filamentos delgados. Mediante técnicas muy sensibles de inmunoblotting se puede detectar su presencia en los primeros estadios del infarto de miocardio, incluso desde la primera hora desde el comienzo de los síntomas, y en pacientes afectados de angina (Aránega *et al.*, 1992). Muestra una elevada especificidad y sensibilidad. No se ve interferida en caso de afectación muscular estriada. Presenta una liberación

bifásica y es detectable hasta los siete días después del episodio isquémico (Aránega *et al.*, 1993).

Además de las Troponinas existen otras moléculas que han sido estudiadas y han demostrado ser útiles en el diagnóstico del daño cardiaco. Este es el caso de la alfa actina. En trabajos realizados por A.E. Aránega en 1991 (Aránega *et al.*, 1991) se aportaban resultados muy interesantes a favor del uso de la alfa actina como marcador molecular de cardiopatía isquémica. Esos trabajos tuvieron continuidad con la sucesiva publicación de nuevos resultados.

Se demostró la liberación de alfa actina circulante en el suero de pacientes con Angina Inestable (Aránega *et al.*, 1992) con una alta sensibilidad, entre el 63,6% y el 100%. En 20 sueros controles sólo se detectó alfa actina en uno de ellos y en otro grupo de 30 individuos con daño muscular esquelético sólo se detectó en 4 de ellos. Estos resultados eran similares a los que obtenían otros autores con la Troponina T (Katus *et al.*, 1989). También se describió una liberación bifásica con un primer pico en la primera hora y otro posterior a las 50 h del inicio de los síntomas. La alfa Actina pudo detectarse durante una semana (175 h) después del comienzo del cuadro clínico. No se encontró significación estadística entre las medias de los diferentes tipos de Angina, ni tampoco relación con el tabaco, hipercolesterolemia, diabetes ni con antecedentes de cardiopatía isquémica previa.

La alfa actina también ha sido detectada en el suero de pacientes con IAM (Aránega *et al.*, 1993).

La alfa actina se trata de un marcador muy precoz por su liberación entre las 0 a 6 horas, como ya indicó (Aránega *et al.*, 1993). Esta cinética puede corresponderse con una rápida y temprana liberación de Actina del compartimento celular citoplasmático que se acompañaría posteriormente del componente estructural.

Está publicado que se detecta alfa actina en el suero de pacientes con Angina Inestable (Aránega *et al.*, 1992) y que la alfa actina es sensible para demostrar pequeños niveles de lesión miocárdica (Prados *et al.*, 1995) en pacientes sin IAM.

Con la alfa actina también está descrito que valores elevados se relacionan significativamente con un mayor número de complicaciones (Aránega *et al.*, 1993). Es decir, la alfa actina puede tener valor también como criterio pronóstico de la Angina Inestable además de diagnosticarla.

## **II. HIPÓTESIS**

### **A. General**

En el contexto del daño músculo esquelético o de la disfunción contráctil, se están empleando marcadores moleculares que detectan daño celular con fines diagnósticos. Principalmente, se están usando las Troponinas (I y T) que son proteínas reguladoras del aparato contráctil. Dentro del conjunto de las proteínas contráctiles intracelulares en los sujetos con daño muscular entendemos que las que se encuentran en mayor cantidad, serán las que tendrán mayores posibilidades de ser liberadas al torrente circulatorio cuando exista lesión celular, como consecuencia del mecanismo de lesión muscular. Una mayor concentración intracelular de proteína en los compartimentos citosólico y/o citoesquelético, permitirá incrementar en mayor medida, y con mayor rapidez, los niveles circulantes de esa proteína en el torrente sanguíneo. Esa mayor rapidez permitirá aumentar la sensibilidad temprana de la prueba. Si a la precocidad, le añadimos la especificidad intrínseca de una molécula de origen exclusivamente músculo esquelética, tendremos un test de mayor potencia diagnóstica que los actuales, en una sola determinación.

Por otra parte, si ganamos en sensibilidad para detectar lesiones de menor extensión, no se necesitará afectar a un gran número de células musculares para incrementar la concentración sérica circulante de la proteína. Esto permitirá alcanzar más fácilmente el rango analítico del método de determinación, y por lo tanto, diagnosticar con mayor sensibilidad el mínimo daño muscular. Al disminuir el nivel de detección de lesión esquelética, estaremos aproximándonos a encontrar un test diagnóstico que pueda identificar a los deportistas con daño muscular hasta ahora limitado su diagnóstico a criterios clínicos (actividad enzimática), resonancias y ecografías de la zona dañada, tras lesiones de importancia.

### **B. Específica**

Aún no se ha encontrado un marcador biológico que represente una solución definitiva al diagnóstico precoz y específico del daño muscular. Se

precisa de un test rápido y fiable que permita anticipar la terapéutica adecuada y el tratamiento específico de ese deportista.

Pensamos que la alfa actina reúne potencialmente unas características que la pueden convertir en un nuevo y más eficaz marcador bioquímico de daño músculo-esquelético. Se trata de una proteína muy abundante en el citoplasma, en mucha mayor concentración que los marcadores empleados actualmente y que tiene una isoforma específica del músculo esquelético.

Estimamos que la alfa actina es un candidato ideal para responder a las carencias diagnósticas que poseen otros marcadores y consideramos que evaluar sus resultados comparativamente en las mismas muestras con otros marcadores actualmente en uso podría reportarnos información muy interesante y todavía inédita acerca de su utilidad en el terreno del rendimiento deportivo.



### **III. OBJETIVOS**

## **A. Generales**

Analizar la utilidad diagnóstica de los diferentes marcadores bioquímicos como marcadores de daño músculo esquelético. En especial estamos interesados en la precocidad en el diagnóstico, y evaluar posibles interferencias derivadas del daño cardiaco. Avanzar en el estudio de la  $\alpha$ -Actina como marcador bioquímico de daño músculo esquelético y compararlo con la actividad de creatina fosfoquinasa (CPK), troponina T (TnT), troponina I (cTnI), mioglobina (MIO) y lactato deshidrogenasa (LDH) en diferentes grupos de estudio, sujetos sedentarios (con traumatismo y sanos) y deportistas (lesionados y sanos).

## **B. Específicos**

1. Determinar  $\alpha$ -Actina sarcomérica en suero de pacientes con daño músculo esquelético severo comprobado, y compararla con los resultados de CPK actividad, Troponina I, Troponina T y Mioglobina obtenidos en los mismos pacientes.
2. Comparar los resultados obtenidos, de los pacientes con daño músculo esquelético severo comprobado, con los niveles de  $\alpha$ -Actina sarcomérica, CPK actividad, LDH, troponina I, troponina T y mioglobina de un grupo de sujetos sanos.
3. Determinar  $\alpha$ -Actina sarcomérica en suero de deportistas con daño músculo esquelético y deportistas sanos y compararla con los resultados de CPK actividad, LDH, troponina I, troponina T y mioglobina obtenidos en los mismos sujetos.
4. Estudiar que marcador se libera más precozmente, con la finalidad de poder adelantar el diagnóstico, y practicar medidas terapéuticas más tempranas que puedan mejorar el pronóstico del paciente.
3. Estudiar que marcador puede detectar mejor el menor daño muscular.

4. Investigar los índices de daño muscular en sangre después de un partido de alta competición y después de un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante.



## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. GRUPOS DE PACIENTES

Nuestro estudio se llevó a cabo en un total de 134 sujetos. A todos los sujetos se les determinan las siguientes variables para su posterior estudio:

- Edad.
- Sexo.
- Hora de extracción de la muestra.
- Diagnóstico del tipo de daño muscular esquelético que padecen.
- Extracción de muestras a nivel basal y después de diferentes situaciones de esfuerzo físico.

Dichos sujetos fueron agrupados en cuatro categorías diferentes:

- Grupo A: sujetos no deportistas con daño muscular esquelético.
- Grupo B: sujetos sanos no deportistas.
- Grupo C: sujetos deportistas de élite.
- Grupo D: sujetos deportistas con daño muscular esquelético.

La confidencialidad de los datos de los sujetos está asegurada por el uso de una codificación anónima para cada uno de ellos y sus respectivas muestras. Los datos se procesan e interpretan en conjunto como grupo y no individualmente. En el caso de los sujetos del grupo A y B se efectúa una consulta al comité ético del hospital para evaluar la necesidad del consentimiento informado el cual no muestra disconformidad.

### 1.1. GRUPO A, SUJETOS NO DEPORTISTAS CON DAÑO MUSCULAR ESQUELÉTICO

El primer grupo (grupo A) lo constituyen pacientes politraumatizados, ingresados en el Hospital de Traumatología del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves”. El período de tiempo en el que se recogieron las muestras de forma consecutiva fue de Abril a Julio del 2003.

En los 33 pacientes con DAÑO MUSCULAR ESQUELÉTICO, se trata de traumatismos graves producidos por contusiones, accidentes y caídas, este grupo lo constituyen. 24 varones (72,7%) con una media de edad de 37,8 años frente a 9 mujeres (27,3%) con una media de edad de 39,2 años (Tablas 1 y 2).

La aprobación del comité de ética fue obtenida antes de comenzar este trabajo. Las muestras de sangre (5mL) fueron obtenidas después de que el sujeto firmara un consentimiento informado. Los sueros son recogidos de las muestras remitidas al laboratorio de Urgencias del Hospital de Traumatología y Rehabilitación (HRT) desde los servicios de Urgencias y Cuidados Intensivos. El criterio de selección es presentar un valor superior a 500 UI/L de CK total, método de Rosalki (Beckman Instruments, S.L.). Se revisa la historia clínica para descartar antecedentes de patología cardíaca conocida, traumatismo torácico o sospecha de patología cardíaca aguda.

SEXO	N	%
Hombre	24	72,7
Mujer	9	27,3
Total	33	100

Sexo	Hombre	Media	37,8
	Mujer	Media	39,2
Total	Media		47,5

TABLA 1. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DEL GRUPO A. TABLA 2. TABLA DE EDADES, EN AÑOS, DEL GRUPO A



FIGURA 19. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DE LOS SUJETOS CON DAÑO MUSCULAR ESQUELÉTICO DEL GRUPO A.

## 1.2. GRUPO B, SUJETOS SANOS NO DEPORTISTAS

Las muestras tomadas para formar el grupo control de sujetos sanos (grupo B) sin ningún tipo de daño muscular ni lesión, se obtuvo de sueros recogidos del servicio de urgencias durante Agosto y Septiembre de 2003. Se revisaron las historias clínicas de esos pacientes y se descartaron los que presentaban alguna referencia de daño muscular.

El grupo de CONTROL lo constituyen 33 pacientes sanos, 24 varones (72,7%) y 9 mujeres (27,3%) con medias de edad de 54,5 y 76,3 años respectivamente (Tablas 3 y 4).

Son pacientes sin daño muscular esquelético ni patología cardiaca conocida. Las muestras son recogidas sucesivamente de aquellos pacientes que acuden al Servicio de Urgencias del Hospital Universitario "Virgen de las Nieves" (Centro Médico Quirúrgico) por otra causa que no sea de origen músculo esquelético. Se revisan todas y cada una de las historias clínicas para descartar el antecedente recientes de daño muscular esquelético y de cardiopatía isquémica.

SEXO	N	%
Hombre	24	72,7
Mujer	9	27,3
Total	33	100,0

Sexo	Hombre	Media	54,5
	Mujer	Media	76,3
Total	Media		58,5

TABLA 3. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DEL GRUPO B. TABLA 4. TABLA DE EDADES, EN AÑOS, DEL GRUPO B.

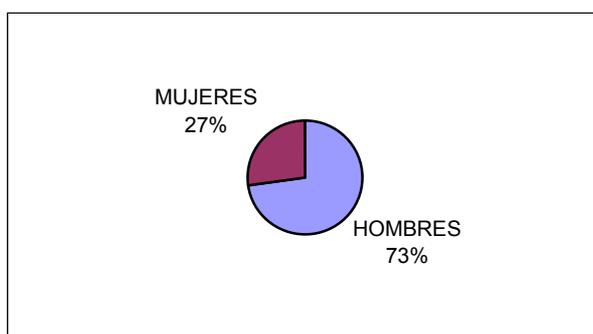


FIGURA 20. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DE LOS SUJETOS SANOS DEL GRUPO B.

### 1.3. GRUPO C, SUJETOS DEPORTISTAS DE ÉLITE

El grupo de sujetos más importante es el de deportistas de élite (grupo C). El método seguido para captar a los deportistas ha sido seleccionar a todos los que llegaban al Centro Andaluz de Medicina de Deporte (CAMD, Sevilla) para una valoración funcional del estado físico o para su preparación física en el centro, también se contó en este grupo con la participación del equipo de balonmano de la universidad de granada y el equipo de rugby. A estos sujetos se les realizó una extracción sanguínea a su llegada al mismo durante los meses de septiembre, octubre y noviembre de 2003.

El grupo de deportistas de élite está formado por 48 sujetos, 6 mujeres (12,5 %) y 42 hombres (87,5 %) con unas medias de edad de 28,6 en los hombres y de 27.3 en las mujeres. El rango de edad en los hombres se encuentra entre los 15 y los 38 años y en las mujeres, desde los 19 hasta los 32 años (Tablas 5 y 6).

SEXO	N	%
Hombre	42	87,5
Mujer	6	12,5
Total	48	100,0

Sexo	Hombre	Media	28,6
	Mujer	Media	27.3
Total	Media		27.8

TABLA 5. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DEL GRUPO C. TABLA 6. TABLA DE EDADES, EN AÑOS, DEL GRUPO C.

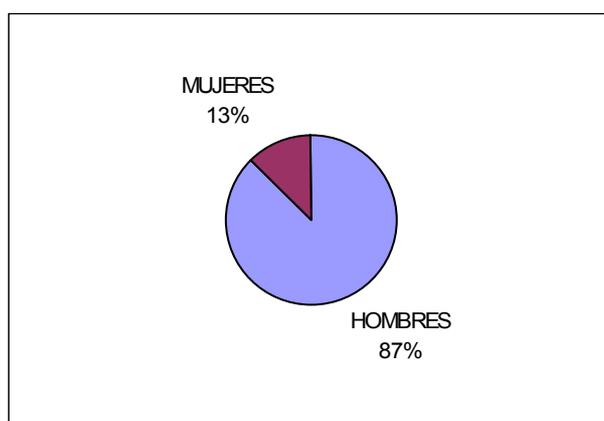


FIGURA 21. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DE LOS DEPORTISTAS DEL GRUPO C.

Dentro de este grupo se hicieron varios subgrupos dependiendo de la especialidad realizada por los deportistas (deportes de equipo y deportes individuales). A estos subgrupos se le hizo un seguimiento mas profundo, realizando varios experimentos para estudiar como varían los parámetros a analizar, ante diferentes situaciones de estrés (como un partido de alta competición o un test de esfuerzo máximo realizado a cada sujeto).

### **1.3.1. Subgrupos:**

- **SUBGRUPO 1:** *DEPORTE DE EQUIPO, BALONMANO*: formado por 16 deportistas, del equipo de balonmano de la Universidad de Granada, que juegan en la división de honor B, siendo todos hombres con una media de edad de 24,5 años.
- **SUBGRUPO 2:** *DEPORTE DE EQUIPO, RUGBY*: formado por 10 deportistas del equipo de rugby de la ciudad de Granada, que juegan en la división B nacional, siendo todos hombres con una media de edad de 27,7 años.
- **SUBGRUPO 3:** *DEPORTES INDIVIDUALES*: formado por 17 sujetos, todos ellos deportistas de atletismo y remo de nivel internacional. Este subgrupo esta formado por 5 mujeres (29 %) y 12 hombres (71 %) con una media de edad de 25 años las mujeres y 27,1 los hombres (Tablas 7 y 8).

Se realizaron dos estudios diferentes con dos subgrupos (Subgrupo 1 y 2) para cuantificar y observar el daño muscular producido en los deportistas, después de la práctica de un partido de alta competición, y después de un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante. En los dos estudios se midieron los mismos parámetros: mioglobina (Mb), troponinas (TnI, TnT), alfa-actina y la actividad enzimática de CK y LDH variándose solamente las condiciones.

**1º Estudio:** Ver los índices de daño muscular en sangre producidos después de un partido de alta competición de balonmano y de rugby. Este estudio estuvo formado por 23 sujetos, todos hombres, con una edad media de 24,5 años. El estudio se repartió en dos grupos con parecido tamaño muestral.

Los tamaños de los grupos fueron los siguientes: N<sub>1</sub>; 13 jugadores de balonmano y N<sub>2</sub>; 10 jugadores de rugby.

**2º Estudio:** Ver los índices de daño muscular en sangre producidos después de un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante. Este estudio estuvo formado por 9 sujetos hombres con una edad media de 26,5 años correspondientes al subgrupo 1 con el fin de analizar las modificaciones que sufrían las variables en una situación de estrés físico diferente (test de esfuerzo).

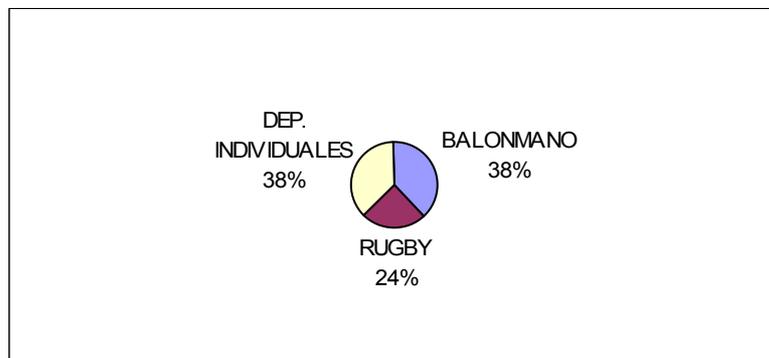


FIGURA 22. DISTRIBUCIÓN POR DEPORTES DE LOS SUBGRUPOS DEL GRUPO C

SEXO	N	%
Hombre	10	62,5
Mujer	6	37,5
Total	16	100,0

Sexo	Hombre	Media	27,1
	Mujer	Media	25
Total	Media		24,6

TABLA 7. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DEL SUBGRUPO 3. TABLA 8. TABLA DE EDADES, EN AÑOS, DEL SUBGRUPO 3.

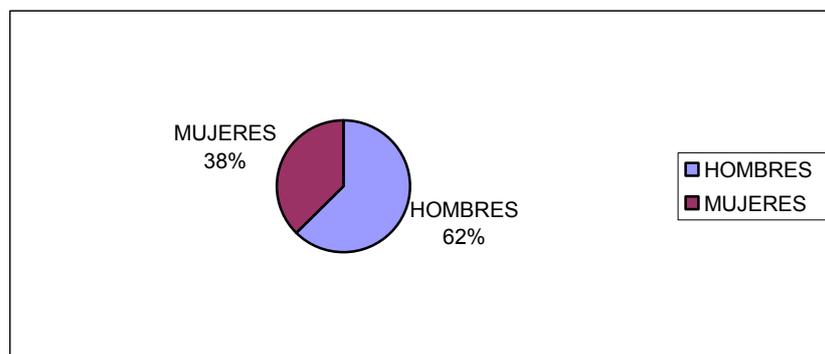


FIGURA 23. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DE LOS DEPORTISTAS DEL SUBGRUPO 3.

#### 1.4. GRUPO D, SUJETOS DEPORTISTAS CON DAÑO MUSCULAR ESQUELÉTICO

El grupo de deportistas que padecen daño muscular esquelético (grupo D) fue reclutado de Octubre a Noviembre de 2003 en el mismo centro de medicina deportiva cuando llegaban al centro para el diagnóstico de la lesión. El criterio de selección fue el análisis a través de resonancia magnética comprobando que se trataba de una lesión músculo esquelético y que no pasaran más de dos días desde que se produjo la lesión. Siendo la lesión más repetida entre los deportistas lesionados la lesión muscular lumbar, encontrando también lesiones en distintas localizaciones corporales, dentro de los deportistas seleccionados, como a nivel femoral, cuádriceps, bíceps, glúteo, tobillo, etc.

El grupo de deportistas lesionados está formado por 20 sujetos, 7 mujeres (35 %) y 13 hombres (65 %) con unas medias de edad de 24,15 en los hombres y de 23,4 en las mujeres (Tablas 9 y 10).

SEXO	N	%
Hombre	13	65
Mujer	7	35
Total	20	100,0

Sexo	Hombre	Media	24.15
	Mujer	Media	23.4
Total	Media		23.9

TABLA 9. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DEL GRUPO D. TABLA 10. TABLA DE EDADES, EN AÑOS, DEL GRUPO D.

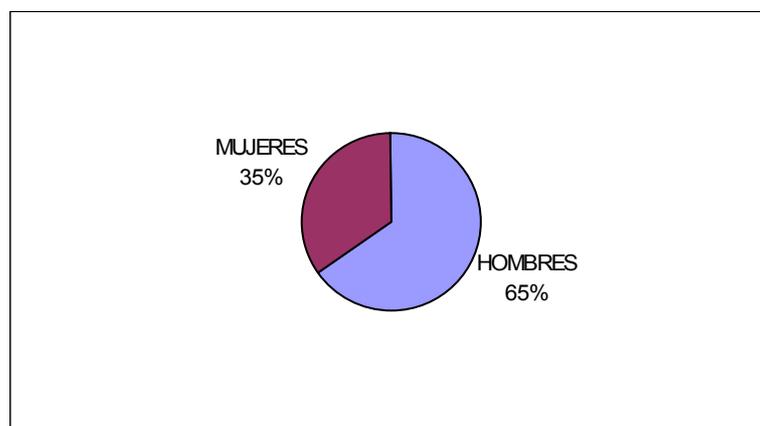


FIGURA 24. DISTRIBUCIÓN POR SEXO DE LOS DEPORTISTAS DEL GRUPO D.

## **2. EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS**

Las muestras de suero se extraen mediante venopunción por personal de enfermería. Se extraen a cada sujeto, aproximadamente 5 mL de sangre. Se recolectan en tubos con gel separador (Venoject II, Terumo Europe). Tras producirse la coagulación se centrifugan durante 10 minutos a 5000 rpm (centrífuga, Beckman Instruments). Se alicuotan sueros para realizar determinaciones en tubos tipo eppendorf de 1,5 mL. El suero que no se va a procesar inmediatamente se congela a -20 °C.

### **2.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS A 2 SUBGRUPOS EN DIFERENTES SITUACIONES Y ESTUDIOS REALIZADOS.**

#### **2.1.1. *Extracción de las muestras en un partido de alta competición.***

Las muestras de suero fueron recogidas del mismo modo que al resto de sujetos estudiados en los anteriores grupos, lo único que variaremos será la toma de las muestras, que se le realizarán varias a cada deportista dependiendo del experimento.

En el partido de alta competición tanto al subgrupo 1 (partido de balonmano) como al subgrupo 2 (partido de rugby), se le tomarán dos extracciones de sangre a cada sujeto. Tomando una antes del partido de competición y otra justo al terminar el partido. Se extraen en cada toma 5 mL de sangre y procesaremos las muestras igual que con el resto de los grupos de estudio.

#### **2.1.2. *Extracción de las muestras en un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante.***

Este estudio se realizará sólo con el subgrupo 1 (jugadores de balonmano), debido principalmente a la agresividad del estudio y el impacto que produce.

Se realizarán 4 extracciones de sangre a cada sujeto. Tomando la primera justo antes de comenzar la prueba de esfuerzo, la segunda extracción se realiza justo al terminar dicha prueba de esfuerzo, la tercera toma se realiza a la hora de haber terminado al prueba y finalmente la cuarta toma se realiza a las veinticuatro horas de haber realizado la prueba de esfuerzo. Se extraen en cada toma de sangre 5 mL de sangre y se procesarán las muestras del mismo modo que las demás.

### 3. PROCESAMIENTO ANALÍTICO

#### 3.1. PROTEINAS TOTALES:

La determinación de Proteínas Totales se ha realizado en un autoanalizador SYNCHRON Cx4 (Beckman Instruments). Se realiza por el método de Biuret a punto final regulado. Durante la reacción, los enlaces peptídicos en la muestra de proteína se ligan a los iones cúpricos, en un medio alcalino, para formar complejos peptídicos con el cobre de color.

El sistema SYNCHRON Cx4 suministra automáticamente el volumen necesario de muestra y de reactivo en la cubeta. La proporción utilizada es una parte de muestra por cada 50 partes de reactivo. El sistema controla la velocidad de cambio de la absorbancia a 560 nm. El cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteína total en la muestra y es utilizado por el sistema SYNCHRON Cx4 para calcular y expresar la concentración de proteína total.



#### 3.2. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras de los sujetos de estudio fueron analizadas en el servicio de bioquímica del Hospital Universitario "San Cecilio". En un sistema

autoanalizador de parámetros bioquímicos, facilitándonos todos los resultados a nivel bioquímico, como: proteínas totales, glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, calcio, fósforo, hierro, potasio, cloro, colesterol, etc. Dichos análisis se realizaron para tener un control medico mas fiable, descartando así la interferencia en los resultados de cualquier anemia o cualquier patología a nivel hematológico.

El aparato utilizado es un autoanalizador Hitachi 911 el cual está configurado para la utilización en la determinación de los parámetros bioquímicos enunciados anteriormente.

### **3.3. ACTIVIDAD TOTAL DE LA CREATIN KINASA**

La determinación de Creatin Kinasa se realiza por un método cinético enzimático. En la reacción, la Creatin Kinasa cataliza la transferencia de un grupo fosfato del sustrato fosfato de creatina al difosfato de adenosina (ADP). La subsiguiente formación de trifosfato de adenosina (ATP) se mide mediante el uso de dos reacciones asociadas, catalizadas por la Hexoquinasa (HK) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), lo que produce un dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD). El ensayo (CK) contiene el activador monotioglicerol.

El sistema SYNCHRON Cx4 suministra en forma automática los volúmenes correctos de muestra y de reactivo en una cubeta. La proporción utilizada es una parte de muestra a 20 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 340 nm. Este cambio es directamente proporcional a la actividad de la Creatin Kinasa en la muestra y es usado por el SYNCHRON Cx4 para calcular y expresar la actividad de la Creatin Kinasa.

### **3.4. ISOENZIMAS DE CREATIN KINASA (CKMM Y CKMB)**

Se realiza a través de un método electroforético con la utilización del estuche de electroforesis para isoenzimas de cretain kinasa (CK). El estuche

de electroforesis para isoenzimas de CK Paragon se utiliza en la separación electroforética de las isoenzimas en suero humano.

La Creatin-Kinasa humana está formada por tres isoenzimas. Las diferencias estructurales en las subunidades de cada isoenzima producen diferentes cargas superficiales. Esta diferencia es la base en la separación electroforética de las tres isoenzimas de CK.

El principio de la electroforesis se basa en que las isoenzimas, situadas en un campo eléctrico, migran hacia uno de los polos eléctrico. El estuche para isoenzimas de CK Paragon se suministra para la separación electroforética de las isoenzimas de CK en un gel de azarosa tamponado. Después de la electroforesis, se produce la detección de las isoenzimas a través de la siguiente reacción fluorométrica específica:



El NADPH se forma en cada banda isoenzimática. Este modelo puede ser interpretado visualmente observando la fluorescencia bajo una luz ultravioleta, o cuantificado en un densitómetro capaz de medir fluorescencia.

**Obtención de muestras:** las muestras de suero deben ser obtenidas siguiendo el proceso normal de laboratorio. La muestra ideal es suero fresco. La actividad de CK en suero es inestable disminuyendo su valor después de 4 horas a temperatura ambiente, 8 a 12 horas en tre +2°C y +8°C y en dos a tres días cuando se congela. Congelaciones y descongelaciones repetidas ocasionan la inactivación enzimática.

**Procedimiento electroforético:**

1. Preparar todas las muestras y controles.
2. Llenar cada compartimento de la cubeta de electroforesis con 45 mL de tampón CK.
3. Llenar un depósito del procesador de líquidos con 300 mL de agua desionizada.
4. Retirar el gel de su embalaje y colocarlo sobre una toalla de papel. Secar cuidadosamente con un secante de gel y desechar éste.
5. Aplicar la plantilla.
6. Aplicar de 3 a 5 µl de muestra a través de las ranuras de la plantilla. Esperar 5 minutos para la difusión de la muestra.
7. Secar cuidadosamente la plantilla con el secante de plantilla. Desechar ambos.
8. Colocar el gel en el puente de la cubeta, alineando las posiciones positivas (+) y negativa (-) del gel con las correspondientes posiciones del puente. Colocar el conjunto en la cubeta de electroforesis.
9. Colocar la cubeta en la Fuente de Alimentación. Fijar la tensión a 100 voltios, encender y mantener la electroforesis durante 20 minutos.
10. Completada la electroforesis, retirar el gel de la cubeta de electroforesis y colocarlo sobre un secante de CK. Situar ambos en la de incubación.
11. Saturar el secante de CK con un vial reconstituido de sustrato CK y colocarlo suavemente sobre la superficie del gel. Evitar las burbujas entre el secante y el gel.
12. Cerrar la unidad de incubación y ponerla en el incubador (45°C) durante 20 minutos.
13. Después de la incubación, retirar el secante de la superficie del gel y desecharlo. Colocar el gel en un marco de geles e introducir tres veces en agua desionizada. El tiempo de lavado no debe exceder de 5 segundos.
14. Colocar el gel en un secador (< 73°C) hasta su secado. Un secado excesivo puede producir un desarrollo erróneo de albúmina.

15. Evaluar el gel visualmente bajo una fuente de luz ultravioleta o en un densitómetro capaz de medir en fluorescencia. La longitud de onda nominal de NADPH es 340 nm para excitación y 455 nm para emisión de fluorescencia.
16. Los geles de CK deben ser evaluados lo más pronto posible luego de su procesamiento; así pueden evaluarse hasta 4 horas después si el gel seco se almacena en un área limpia y oscilar.

### **3.5. MIOGLOBINA**

Realizamos las determinaciones de Mioglobina mediante inmunoensayo de quimioinmunofluorescencia en un equipo Access (Beckman Instruments). Se trata de un inmunoensayo de tipo “sandwich” (con dos anticuerpos). A la muestra se le añade anticuerpo monoclonal de ratón anti-Mioglobina conjugado con fosfatasa alcalina y partículas paramagnéticas recubiertas de anticuerpo monoclonal de ratón anti-Mioglobina. La Mioglobina humana del suero es fijada por la fase sólida, mientras que la anti-Mioglobina conjugada, en fase líquida, reacciona específicamente con otro sitio antigénico de la Mioglobina. Después de incubarse se somete a un proceso de separación mediante un campo magnético que retiene a la fase sólida eliminándose toda la fase líquida. Un sustrato quimioluminiscente (Lumi-Phos 530) es añadido. La intensidad de la luz emitida es medida con un luminómetro. La producción de fotones es proporcional a la cantidad de Mioglobina de la muestra. La cantidad de analito se determina por cálculo usando una curva de calibración multipunto almacenada por el aparato.

### **3.6. TROPONINA I -CARDIO ESPECÍFICA, cTnI**

Realizamos las determinaciones de cTnI mediante inmunoensayo de quimioinmunofluorescencia en un equipo Access (Beckman Instruments). El ensayo Access Troponin I es un ensayo inmunoenzimático (“tipo sandwich”). Se añade una muestra a un vaso de reacción con anticuerpos monoclonales anti-Troponina I cardíaca conjugados con fosfatasa alcalina y partículas

paramagnéticas recubiertas de anticuerpos monoclonales anti-Troponina I cardíaca. La Troponina I cardíaca humana se une al anticuerpo anti-Troponina I cardíaca en la fase sólida, mientras que el conjugado anticuerpo anti-Troponina I cardíaca-fosfatasa alcalina reacciona con lugares antigénicos diferentes en las moléculas de Troponina I cardíaca. Después de la incubación, la separación en un campo magnético y el lavado eliminan los materiales no unidos a la fase sólida. Se añade un sustrato quimioluminiscente, Lumi-Phos 530, al vaso de reacción y se mide la luz generada por la reacción con un luminómetro. La producción de fotones es inversamente proporcional a la cantidad de conjugado enzimático presente al final de la reacción, y por consiguiente, a la concentración de Troponina I cardíaca en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina por una curva de calibración multipunto almacenada.

### **3.7. TROPONINA T- MUSCULO ESQUELÉTICA, cTnT .**

Realizamos las determinaciones de cTnT mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia en un equipo Elecsys 2010 (Roche Diagnostic). Se trata de una técnica sandwich con una duración total del test de 18 minutos a 37°C. En el primer paso de incubación del test Troponina T Elecsys, la muestra, un anticuerpo monoclonal biotinilado específico contra Troponina T y un anticuerpo monoclonal específico contra Troponina T marcado con quelato de rutenio (Quelato Tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) - (Ru(bpy)<sub>2</sub>+3 ) forman un complejo tipo sandwich.

En el segundo paso de incubación, después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina.

La célula de medición electroquimioluminiscente es el componente más importante del sistema. Está diseñada como cámara de flujo y tiene, en principio, tres funciones:

- Separación de las sustancias no fijadas y fijadas: Por medio de un imán, las micropartículas cargadas con inmunocomplejos y recubiertas de

estreptavidina se depositan en el electrodo donde permanecen fijadas durante un breve período de tiempo. Los componentes reactivos no fijados y el material de muestra sobrante se eliminan de la célula de medición con tampón del sistema (ProCell).

- Generación de electroquimioluminiscencia: Al aplicar un voltaje definido se induce la reacción de electroquimioluminiscencia. El fotomultiplicador mide directamente la emisión de luz generada por la reacción.

- Una vez que la reacción de electroquimioluminiscencia se ha completado, se separan las micropartículas de la superficie del electrodo y se eliminan mediante la solución detergente de la célula de medición (CleanCell). La célula de medición está lista para la próxima medición.

El quelato de rutenio constituye la molécula marcadora electroquimioluminiscente. Durante la reacción electroquímica se oxida primeramente  $\text{Ru}(\text{bpy})_2^{2+}$  a  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  en la superficie de los electrodos. Simultáneamente, la tripropilamina sobrante (TPA, componente de ProCell) se oxida a un catión radical  $\text{TPA}^{+\bullet}$  que libera espontáneamente un protón. El oxidante intensivo  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  reacciona con el radical  $\text{TPA}^{+\bullet}$ , un potente agente reductor, para formar el complejo  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  en un estado de excitación eléctrica que, por emisión de un fotón de 620 nm, pasa al estado inicial y está disponible para otro ciclo de reacción.

Un fotomultiplicador mide la intensidad de la señal en “unidades relativas de luz” (RLU = Relative Light Unit). La fase de tensión dura 1.4 segundos en total. En la medición se considera el curso de la señal durante 0.4 segundos.

### 3.8. ALFA-ACTINA

La determinación de alfa actina sarcomérica se realiza por medio de Western-Blott.

Los anticuerpos que hemos utilizado han sido los siguientes:

### Ac Primario

Anticuerpo monoclonal (Ig M, kappa) de ratón anti Actina sarcomérica de conejo, Clone alfa-Sr-1 (Dako, Dinamarca).

### Ac Secundario

Goat anti-mouse Ig M (molécula completa) conjugado con peroxidasa de rábano picante tipo VI (Santa Cruz Biotechnology, INC).

El protocolo de Western-Blott utilizado es el siguiente:

### Preparación de las muestras

Descongelamos las muestras. Conocida la concentración de proteínas totales preparamos una dilución con tampón de muestra (SAMPLE BUFFER) para obtener una concentración de proteínas de 1 mg/mL en todas las muestras a procesar. Los cálculos se realizan mediante la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{cccc} \text{Volumen inicial} \times \text{Concentración inicial} & = & \text{Volumen final} \times \text{Concentración final} \\ (\mu\text{L}) & & (500 \mu\text{L}) & (1 \text{ mg/mL}) \end{array}$$

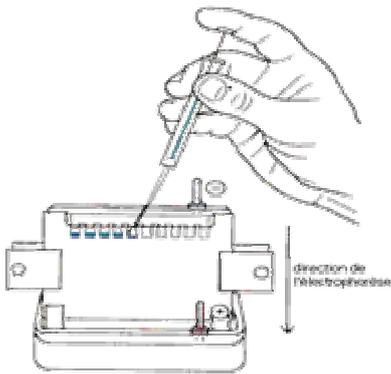
La variable volumen inicial nos indica la cantidad de muestra del sujeto que debemos emplear para alcanzar la concentración deseada de 1 mg/mL. De la diferencia entre el volumen inicial (muestra de suero del paciente) y 500  $\mu\text{L}$  de volumen total final deducimos la cantidad de SAMPLE BUFFER que debemos adicionar para alcanzar la dilución deseada. La muestra así obtenida la sometemos a una electroforesis SDS-PAGE.

### Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es sin duda alguna una de las técnicas

más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica.



Algunas características destacables de la electroforesis en geles de poliacrilamida son:

- Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ( $S_2O_8^{2-}$ ) que se añade en forma de persulfato amónico.
- La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).
- La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.

- El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del tanto por ciento (%) de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes.

- Una electroforesis desnaturalizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.

La electroforesis en geles de acrilamida se puede realizar empleando sistemas de uno o más tampones, en estos casos se habla de sistemas tampón continuos o discontinuos. En los sistemas discontinuos el primer tampón asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo tampón. El primer gel de apilamiento ('stacking') es de mayor poro (menor porcentaje de acrilamida+bisacrilamida) y tiene un pH más ácido que el segundo gel que es el que realmente separa las proteínas. Este sistema es especialmente adecuado para analizar muestras diluidas sin perder resolución.

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza

en presencia de SDS ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis'). Fue descrito por Laemmli (Lammeli (1970), Nature, 277, p. 680). Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro y SDS que desnaturiza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

En general, se emplean sistemas de dos tampones (discontínuos). Este sistema permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución. La concentración se produce por isotacoforesis de la muestra en el primer gel ('stacking'). El efecto de estrechamiento de las bandas se basa en el hecho de que los iones glicinato, relativamente cargados negativamente (en el depósito de tampón superior) tienen una movilidad electroforética inferior que los complejos de proteínas-SDS, que a su vez tienen menor movilidad que los iones Cl<sup>-</sup> de los tampones de carga en el gel de apilamiento ('stacking'). Cuando se conecta la diferencia de potencial todas las especies han de migrar a la misma velocidad para mantener el circuito eléctrico. Los iones glicinato sólo se pueden desplazar a la misma velocidad que los iones Cl<sup>-</sup> si hay una región de 'field strenght'. 'Field strenght' es inversamente proporcional a la conductividad que es a su vez proporcional a la concentración.

El resultado es que las tres especies de interés ajustan sus concentraciones de forma que  $[Cl^-] > [proteína-SDS] > [glicinato]$ . Como sólo hay una pequeña concentración de proteína-SDS las tres se concentran en una banda muy delgada entre las fronteras de migración del Cl<sup>-</sup> y del glicinato. Cuando el glicinato alcanza el borde del gel de separación adquiere una mayor carga en el nuevo medio, con un pH superior, e incrementa su movilidad. A partir de ese momento la interfase entre el glicinato y el Cl<sup>-</sup> deja atrás a los complejos de proteína-SDS que se desplazarán a su propia velocidad. SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos

aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular.

### Procedimiento

Se monta la cámara de electroforesis (Mini Protean II, Bio-Rad) se añade el gel inferior preparado según protocolo y se utiliza alcohol isopropílico para evitar las burbujas y nivelar el gel. Cuando el gel inferior ha gelificado se retira el alcohol isopropílico con papel de filtro. Posteriormente se añade el gel superior (stacking) e inmediatamente después se sitúan los peines con cuidado para evitar la formación de burbujas.

Una vez que el gel superior ha gelificado se sitúa la cámara en la cubeta de electroforesis. En esta cubeta se añade tampón de electroforesis, que puede ser mantenido a 4°C durante varios días. Este tampón se añade en el centro de la cámara y se deja que rebose, llegando a alcanzar una altura por la parte externa de alrededor de 4 cm. En cada pocillo la carga de muestra es de 15 µl y se realiza con una jeringa Hamilton. Se conecta la electroforesis manteniendo constante la intensidad de la corriente en 40 mA (20 mA por cada gel) durante 45 minutos. Hacia la mitad de la misma la tensión es de unos 200 voltios. Pasado este tiempo la línea de frente está aproximadamente a 1 cm del borde de la cámara.

### Transferencia

La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de 'blots'. El método más potente es el denominado 'Western blot' en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel a una membrana. El procedimiento es análogo al desarrollado por el Prof. E. Southern ('Southern blotting') y por ello se le denominó 'Western'. Hay sin embargo otros métodos de transferir o aplicar proteínas sobre una membrana. El más sencillo es aplicarlas directamente en forma de una pequeña gota de una solución concentrada sobre la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o 'dot' (es el caso del 'dot blot'). Existen dispositivos que facilitan la aplicación de las proteínas directamente a la membrana, aplicando una succión que facilita la penetración de la solución, y reciben los nombres de 'dot blot' o 'slot blot' en función de que la proteína quede aplicada en forma de una gota circular o de una línea. Trabajar con las proteínas fijadas sobre una membrana tiene ventajas sobre el emplearlas dentro del propio gel. Son más rápidas de teñir y desteñir, se detectan cantidades menores de proteínas pues se concentran en la superficie y no se diluyen en todo el espesor del gel y las membranas son mucho más fáciles de manipular que el propio gel. Todo procedimiento de 'blotting' consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de proteínas sobre la membrana ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión,...) o mediante aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.

3. Incubación del 'blot' con anticuerpo primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del 'blot' con anticuerpos secundarios, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

En el caso de los geles de poliacrilamida el método de elección es la transferencia electroforética. La transferencia es mucho más efectiva si se realiza aplicando una diferencia de potencial entre el gel y la membrana.

En este método, descrito por Towbin, las proteínas son transferidas desde el gel a la membrana electroforéticamente. La ventaja de este proceso es su corta duración (de 30 min a pocas horas), lo que reduce notablemente el efecto de difusión de las bandas. El procedimiento se inicia apilando sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro empapado en tampón de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en un tanque en el que se encuentra una solución salina (tampón de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). La carga neta de las proteínas en el caso de los geles de SDS-PAGE es positiva debida a la carga del SDS

La electroforesis se realiza a 8-10 V/cm (de separación entre electrodos), que suele corresponder a 0.3 a 2. Amp de 1 a 4 h. La velocidad de transferencia es inversamente proporcional al tamaño de la proteína.

El proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución por lo que se recomienda refrigerar el sistema y recircular el tampón. Una vez realizada la

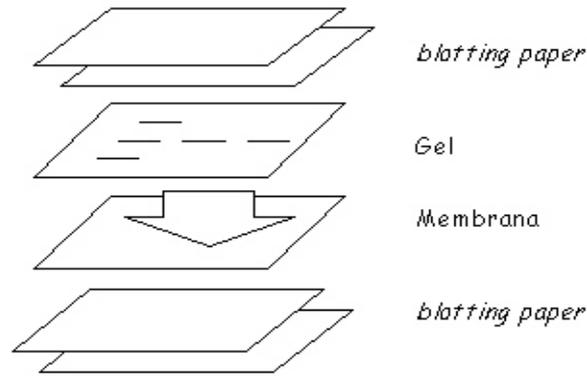
transferencia la membrana se puede analizar inmediatamente o bien conservarla en frío (2 a 8°C) durante meses.

El grosor del gel es un factor que influye notablemente en la transferencia, siendo muy ineficiente a partir de geles de 2 mm de espesor, y tanto más eficiente cuanto más fino es el gel, con un límite debido a los problemas de manipulación en torno a los 0.4 mm.

La membrana que se emplea más frecuentemente es la nitrocelulosa, aunque cuando se requieren soportes más robustos, por ejemplo cuando la membrana ha de ser reutilizada diversas veces se recurre al Nylon. Sin embargo las membranas de Nylon se bloquean con más dificultad que las de nitrocelulosa y suelen presentar mayor 'background'. Las membranas de PVDF tienen gran capacidad de unión a proteínas y gran resistencia mecánica pero se humedecen con más dificultad.

Todas las membranas son hidrofóbicas y requieren un tratamiento previo con metanol antes de sumergirlas en soluciones acuosas. Existen algunas variantes a la transferencia electroforética descrita previamente. El sistema más extendido es el 'Semi-Dry blotting' en el que los geles son sometidos a una intensidad de corriente elevada entre dos electrodos planos entre los que se coloca una pila formada por papel, el gel, la membrana y más papel, empapados en tampón de transferencia. El único líquido que hay es el que empapan los papeles. La ventaja de este sistema es su rapidez, consiguiendo transferencias en pocos minutos. Nosotros nos hemos decidido por esta última variante.

En una cubeta se dispone el tampón de transferencia que debe ser preparado en el mismo día, (250 ml) y, por cada gel en forma de "sandwich" se disponen:



1. 2 rectángulos de papel "Whatman" (70 x 90 mm)
2. 1 rectángulo de nitrocelulosa (60 x 80 ) (la cual ha estado previamente en agua durante 10 minutos )
3. Gel de acrilamida. Al cual se le elimina la parte correspondiente al gel superior y se marca con unos cortes en bisel (gel1) o en escuadra (gel2) en el extremo inferior izquierdo señalando la posición del pocillo 1 para su posterior reconocimiento.
4. 2 rectángulos de papel "Whatman" (70 x 90 mm). Todo el conjunto se mantiene sumergido durante 20 minutos.

Posteriormente se sitúa el "sandwich" en el equipo de transferencia (Trans-Blot SD, Bio-Rad). Las condiciones eléctricas son mantener constante la intensidad en 60 mA durante 45 minutos. El voltaje asociado no supera los 5 voltios. Con cuidado de que la membrana de nitrocelulosa quede debajo del gel y que éste no quede fuera del perímetro de la nitrocelulosa. Hay que evitar la presencia de burbujas para lo cual puede rodarse un tubo de ensayo sobre el "sandwich". Tras la transferencia la nitrocelulosa se separa del gel y se le hacen las mismas marcas o cortes que el gel sobre el cual se ha transferido. Se mantiene durante 1 h en 20 ml de solución de bloqueo a temperatura ambiente, o 3 h si lo dejamos en el frigorífico (4°C).

### Incubación

#### Anticuerpo Primario

Tras el bloqueo, la membrana de nitrocelulosa es incubada con el anticuerpo primario, que es añadido a 10 ml de solución de bloqueo (1/1000, 10 mL de solución de bloqueo y 20 µL de anticuerpo primario) y debe permanecer en movimiento-agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, o 24 h si lo dejamos en el frigorífico (4°C).

Tras la incubación se realizan 3 lavados de 5 minutos también en movimiento para facilitar la retirada del anticuerpo primario con solución de lavado.

#### Anticuerpo Secundario

La membrana de nitrocelulosa es incubada ahora con el anticuerpo secundario (1/800, 25 µL de anticuerpo que es añadido a 20 ml de solución de bloqueo) y debe permanecer en movimiento durante 1 hora. Tras este período tiene lugar de nuevo los lavados. Se realizan 3 lavados de 5 minutos también en movimiento para facilitar la retirada del anticuerpo secundario.

### Detección

Una vez que tenemos la membrana lavada procedemos a la detección de la proteína por quimioluminiscencia. En oscuridad se prepara 4 mL de Supersignal (ECL, Plus, Amersham) mediante dilución 1:1 de sus dos componentes. Se agita suavemente durante 5 minutos para que la superficie de la membrana entre en contacto con el reactivo quimioluminiscente. Una vez pasado este tiempo se sitúa entre dos bandas de plástico en el interior del hipercasete. En oscuridad se recorta la película radiográfica (AGFA, FILM Amersham) y se sitúa sobre el plástico que envuelve la nitrocelulosa a la altura

donde se empiecen a ver las bandas, con las mismas marcas o cortes que la membrana de nitrocelulosa sobre la cual se sitúan. Se mantiene dentro del hipercassette unos 10 segundos para que la película se impresione. Posteriormente se introduce la película impresionada en una reveladora automática de radiografías (AGFA) donde tarda 90 segundos en realizarse el proceso de revelado. Obteniéndose la película con la imagen de la proteína.

### Análisis de Imagen

Se realiza análisis densitométrico mediante escaneado de las imágenes obtenidas por radiografía a partir de las membranas. La resolución de las imágenes obtenidas es de 100 ppp (puntos por pulgada). Utilizando software de tratamiento de imagen (Adobe Photoshop 5.0, Adobe Systems Inc.) realizamos un tratamiento de las imágenes guardándolas toda en formato Tif para posteriormente abrir dichas imágenes desde el software que nos permite cuantificar las imágenes escaneadas. Este procedimiento se repitió para todas y cada una de las muestras procesadas en este trabajo. Con este procedimiento resultaban imágenes digitales formadas por 10 pocillos, de los cuales uno de ellos en todas las imágenes pertenecía al control positivo (actina pura) y otro al peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range, Bio-Rad) quedándonos así 8 pocillos para las muestras de los sujetos analizados. Mediante el software Quantity One 1-D Analysis Software, de análisis densitométrico de imagen (BIO-RAD). Se realizaba comparación entre los distintos pocillos referidos al control positivo al cual le damos un valor absoluto determinado y calculado. Así se determinaron los valores absolutos de la alfa actina en todas las muestras procesadas.

### Cuantificación de Actina a nivel absoluto

Para obtener una curva estándar (para cuantificar en ng/mL) se realizó un inmunobloting con cantidad de proteínas conocidas ( $\alpha$ -actina pura, sigma) y las bandas obtenidas fueron también cuantificadas densitométricamente.

Para obtener la curva estándar cargamos actina pura en diferentes proporciones junto con el peso molecular para comprobar que la banda de la actina coincide con su peso molecular. Partimos de una proporción inicial de 99  $\mu\text{l}$  de S.B (solución que se añade a la muestra) y 1  $\mu\text{l}$  de actina pura, siendo este el 100 % de la carga que vemos reflejado en la imagen de abajo.

%	PROTEINA PURA
100 %	0,16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
75 %	0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
50 %	0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
25 %	0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
10 %	0,016 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

TABLA 11. DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACTINA.

Una vez realizada la recta de concentración de actina ya podemos conocer la cantidad absoluta de actina que contiene cada sujeto. Para ello en cada gel ponemos un control positivo (0,16  $\mu\text{g}/\mu$  de actina pura) con una cantidad conocida de actina y en función a esa banda cuantificamos las demás, obteniendo así valores absolutos (Figuras 25 y 26).

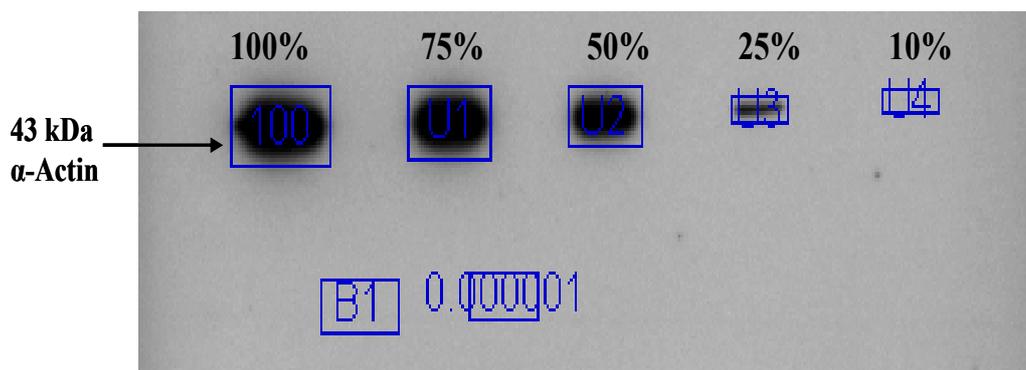
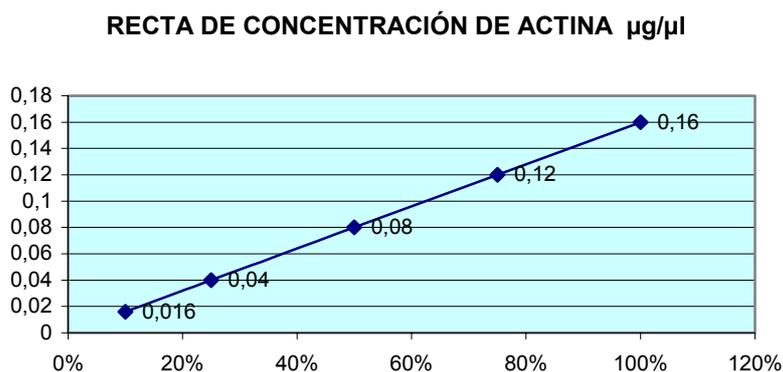


FIGURA 25. CONCENTRACIÓN DE ACTINA EN DIFERENTES CONCENTRACIONES



**FIGURA 26. RECTA DE CONCENTRACIÓN DE ACTINA CON LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACTINA.**

#### **4. TEST DE ESFUERZO.**

La base del test de esfuerzo que se realizará a los sujetos será el generar una determinada actividad muscular, llevando la prueba hasta el agotamiento físico o hasta alcanzar criterios de maximalidad, ya que se tratará de una prueba máxima, con el objetivo de producir desgaste muscular y como consecuencia de este desgaste posible daño muscular.

En los tests que realizamos resulta fundamental controlar los criterios de standarización en los protocolos, condiciones metabólicas que debe reunir el sujeto, criterios de maximalidad del test, indicaciones y contraindicaciones, instrucciones y preparación del sujeto, criterios de actuación ante emergencias, criterios de valoración y criterios de calidad. Los protocolos serán los valores que cuantifiquen la intensidad y la duración del esfuerzo al que se someta el sujeto. Existen distintos protocolos para la realización de dicho test de esfuerzo, nosotros utilizamos un protocolo adaptado a según los objetivos planteados para el test, el tipo y estado de físico de los deportistas analizados y los parámetros que se quieren medir.

En la realización del test de esfuerzo se establecerá un límite de seguridad que corresponderá al 85% de la frecuencia cardíaca máxima teórica, calculada en base a la fórmula:

$$F_c \text{ max teórica} = 210 - [0.65 \cdot \text{edad (años)}]$$

El test de esfuerzo se detiene por tanto cuando: (1) se alcanza este límite de seguridad; (2) aparece alguna circunstancia anómala no controlable; ó (3), el sujeto no es capaz de soportar por más tiempo el esfuerzo físico requerido. Esta última será la causa más frecuente de la detención del test de esfuerzo en los deportistas analizados ("symptom-limited exercise").

**Las Variables a monitorizar durante el test de esfuerzo fueron:** (1) las destinadas a cuantificar el valor de  $VO_2$  que el deportista es capaz de generar durante el esfuerzo ( $VO_{2max}$ ); (2) la frecuencia cardiaca que lleva el deportista durante la practica del test de esfuerzo; y (3) la percepción subjetiva que tiene el deportista durante la practica de dicho test.

La determinación del  $VO_{2max}$ . Se llevó a cabo a través del análisis del gas espirado:

*Análisis del gas espirado.* Si se conoce la ventilación minuto ( $V_E$ ) y la concentración de  $O_2$  inspirado ( $F_{I,O_2}$ ) y espirado ( $F_{E,O_2}$ ) puede calcularse la cantidad de  $O_2$  consumido ( $VO_2$ ) en base al principio de equilibrio de masas. Pare ello disponemos de un sistema medidor de  $O_2$  (analizador paramagnético o espectrómetro de masas) y de un método capaz de cuantificar la ( $V_E$ ) (recogida en bolsas de Douglas con medición posterior en espirómetro o integración de la señal del flujo espirado que recoge un neumotacógrafo).

**Protocolo utilizado en el test de esfuerzo máximo:**  $W_0$  25 W con incrementos de 25 Wx min hasta agotamiento

Durante este estudio, con la finalidad de conocer en qué medida se ve afectado el comportamiento ergoespirométrico, metabólico y de desgaste muscular de los sujetos, ha sido empleado un protocolo incremental máximo, el de McLellan (1985). En este protocolo se partió de una carga inicial de 25 vatios, que se incrementaba en otros 25 vatios cada minuto hasta llegar al agotamiento.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación presentaremos el análisis estadístico realizado en los diferentes estudios que hemos realizado dentro de la elaboración de este trabajo. Estando formado por cuatro estudios diferentes que pasaremos a desarrollar a continuación.

Los datos obtenidos fueron tratados con el programa informático SPSS (versión 12.0.1 para Windows, SPSS Inc. 2003). Se consideró valor significativo para  $p < 0,001$ .

### 5.1. ESTUDIO 1.

Diseñamos el estudio 1 para comparar los niveles de los marcadores analizados entre los distintos grupos de sujetos. La investigación realizada, para dicho estudio, es cuasi-experimental ya que la variable independiente es seleccionada no manipulada.

Dado el conjunto de variables dependientes cuantitativas (6 Variables dependientes) y una variable independiente con cuatro niveles (1 Variable independiente, entregrupos (EG) 4 niveles), podemos decir que se trata de un estudio multivariable (6 VDs) unifactorial (1 VI EG con 4 niveles). Y en consecuencia tenemos que utilizar para el análisis estadístico un análisis multivariante de la varianza (MANOVA) o Kuskall-Wallis (test no paramétrico). Los tamaños de los grupos son los siguientes (N1: 33; N2: 33; N3: 48; N4: 20).

#### **Variables dependientes:**

- VD<sub>1</sub>: Troponina I (TnI)
- VD<sub>2</sub>: Mioglobina (MIO)
- VD<sub>3</sub>: Troponina T (TnT)
- VD<sub>4</sub>: Actina (ACT)
- VD<sub>5</sub>: CreatinKinasa (CK)
- VD<sub>6</sub>: Lactato dexihidrogenasa (LDH)

**Variable Independiente:**

- **Grupo (Entregrupos, 4 niveles)**
  - Grupo 1: Accidentados
  - Grupo 2: Control, sujetos sanos.
  - Grupo 3: Deportistas Élite sanos
  - Grupo 4: Deportistas Lesionados

El análisis multivariante de la varianza (MANOVA) consiste en analizar el comportamiento de las  $p$  variables dependientes en las  $K$  subpoblaciones o grupos establecidos por las combinaciones de los valores de las independientes (Ferrán Aranaz 1996). En nuestro caso  $K=4$  y  $p=6$ . El MANOVA se emplea para contrarrestar la significación estadística de las diferencias entre los grupos.

Esta indicado el MANOVA por contraste de Bartlett de esfericidad [ $\chi^2_{20}$  aprox.= 6315,256;  $p= 0.0001$ ]. Observándose la relación lineal entre las variables dependientes (VDs) por lo que está indicado el multivariable.

Al comprobar los supuestos del MANOVA se detecto incumplimientos importantes. Así, el contraste de Box, que estudia el supuesto de multicolinealidad, se incumple [M de Box = 1609,556;  $F_{62, 20938.26}= 23,149$ ;  $p= =.0001$ ]. Además a través de la realización del contraste de Levene, que nos da significativo para todas la variables (mayor de 0,00001), observamos que también incumple los supuestos de normalidad y de homocedasticidad (Tabla 3 Apéndice).

Por lo tanto, en este primer estudio y debido al incumplimiento de los supuestos del MANOVA se opta por un *análisis estadístico no paramétrico*, ya que este es válido cuando las distribuciones poblacionales no verifican las condiciones exigidas por otras técnicas estadísticas, ni sean iguales las  $K$  varianzas, es decir, cuando no sea aplicable al análisis de varianza (un solo factor).

Analizamos para cada variable dependiente (VD) el efecto de la variable independiente (VI grupo) mediante la *prueba de Kruskal-Wallis*. Tras la realización de esta prueba de estadístico de contraste observamos que todas las variables dependientes son significativas (Tabla 24), por lo tanto analizamos los pares de grupos dos a dos mediante la prueba no paramétrica U-Mann-Whitney (Tablas 25-30).

## 5.2. ESTUDIO 2.

El segundo estudio se diseñó para comparar las modificaciones de los diferentes marcadores en las distintas disciplinas deportivas estudiadas (subgrupos del grupo C de deportistas de élite). La investigación realizada, para dicho estudio, es cuasi-experimental ya que la variable independiente es seleccionada no manipulada.

Dado el conjunto de variables dependientes cuantitativas (6 Variables dependientes) y una variable independiente con cuatro niveles (1 Variable independiente, entregrupos (EG) 3 niveles), podemos decir que se trata de un estudio multivariable (6 VDs) unifactorial (1 VI EG con 3 niveles). Y en consecuencia tenemos que utilizar para el análisis estadístico MANOVA unifactorial. Los tamaños de los grupos son los siguientes (N1: 16; N2: 10; N3: 17).

### **Variables dependientes:**

- VD<sub>1</sub>: Troponina I (TnI)
- VD<sub>2</sub>: Mioglobina (MIO)
- VD<sub>3</sub>: Troponina T (TnT)
- VD<sub>4</sub>: Actina (ACT)
- VD<sub>5</sub>: CreatinKinasa (CK)
- VD<sub>6</sub>: Lactato dexihidrogenasa (LDH)

### **Variable Independiente:**

- **Grupo (Entregrupos, 3 niveles)**
  - Grupo 1: Balonmano (16)

- Grupo 2: Rugby (10)
- Grupo 3: Individual (17)

El aspecto propio del MANOVA unifactorial es que el valor teórico combina óptimamente las medidas dependientes múltiples dentro de un valor único que maximiza las diferencias entre los grupos. En nuestro caso  $K=3$  y  $p=6$ . El MANOVA se emplea para contrarrestar la significación estadística de las diferencias entre los grupos.

Esta indicado el MANOVA por contraste de Bartlett de esfericidad [ $\chi^2_{20}$  aprox.= 1526,724;  $p= 0.0001$ ]. Observándose la relación lineal entre las variables dependientes (VDs) por lo que está indicado el multivariable. Cumpliéndose así el supuesto de linealidad entre variables dependientes.

Al comprobar los supuestos del MANOVA se detecto el cumplimiento de todos los supuestos del análisis. Así, el contraste de Box, que estudia el supuesto de multicolinealidad, se cumple [M de Box = 115,301;  $F_{42, 2957.258}= 2,080$ ;  $p= .0001$ ]. Además a través de la realización del contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas, observamos que tan sólo nos da significativo en dos variables dependientes (mayor de 0,00001), cumpliéndose así este supuesto de MANOVA (Tabla 6 Apéndice). También podemos ver como a través de la realización de la Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra, se cumple el supuesto de normalidad en todas las variables dependientes (Tabla 5 Apéndice).

Por lo tanto, en este segundo estudio y debido a que se cumplen todos los supuestos del MANOVA se opta por un análisis estadístico *MANOVA unifactorial*, ya que este es válido para analizar el comportamiento de las  $p$  variables dependientes en las  $K$  subpoblaciones, o grupos establecidos por las combinaciones de los valores de las independientes.

En dicho estudio primero analizamos MANOVA con todos los datos, siendo el análisis significativo para el vector de medias de Vds (Tabla 37). Los grupos han provocado diferencias significativas en el vector de medias de las

VDs (Tabla 37). Siendo la Traza de Pillai=0,928;  $F_{12, 72} = 7,528$ ;  $p = .0001$ ;  $\eta^2_{\text{parcial}} = 0,556$ ]. A continuación se realizó un estudio Post-Hoc de las variables dependientes que nos habían dado significatividad en el anterior análisis, realizándose el estudio Post-Hoc de todas las VDs, excepto de la V Tnl y la V Mioglobina, que no fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) en este estudio (Tablas 38-41).

En este estudio para realizar comparaciones por pares, también utilizamos el análisis no paramétrico. Por lo tanto, para cada variable dependiente (VD) el efecto de la variable independiente (VI grupo) mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 38). Tras la realización de esta prueba de estadístico de contraste, observamos que sucedía igual que en análisis de MANOVA, que todas las variables dependientes son significativas excepto la mioglobina y la Tnl, por lo tanto analizamos los pares de grupos dos a dos mediante la prueba no paramétrica U-Mann-Whitney (Tablas 7, 8 y 9 Apéndice).

### 5.3. ESTUDIO 3.

Con este estudio pretendimos analizar como varían los marcadores en un partido de alta competición entre los subgrupos de deportistas de balonmano y rugby (subgrupo 1 y 2 del grupo C). La investigación realizada, para dicho estudio, es cuasi-experimental ya que la variable independiente es seleccionada no manipulada.

Dado el conjunto de variables dependientes cuantitativas (6 Variables dependientes) y dos variables independientes con dos niveles (1 Variable independiente entregrupos (EG) con 2 niveles y otra intra sujeto (IS) Pre-Post con 2 niveles), podemos decir que se trata de un estudio multivariable (6 VDs) bifactorial (1 VI EG con 2 niveles). En consecuencia, tenemos que utilizar un análisis estadístico *MANOVA bifactorial mixto* para cada VD. Los tamaños de los grupos son los siguientes (N1: 13; N2: 10).

**Variables dependientes:**

- VD<sub>1</sub>: Troponina I (TnI)
- VD<sub>2</sub>: Mioglobina (MIO)
- VD<sub>3</sub>: Troponina T (TnT)
- VD<sub>4</sub>: Actina (ACT)
- VD<sub>5</sub>: CreatinKinasa (CK)
- VD<sub>6</sub>: Lactato dexihidrogenasa (LDH)

**Variable Independiente:**

- **VI<sub>1</sub>:Grupo (Entregupos, 2 niveles)**
  - Grupo 1: Balonmano
  - Grupo 2: Rugby
- **VI<sub>2</sub>:Momento (Intrasujeto o Medidas Repetidas, 2 niveles)**
  - Momento 1, PRE: Antes del partido
  - Momento 2, POST: Después del partido

Para poder realizar el análisis multivariable multifactorial tiene que cumplirse los siguientes supuestos de análisis. Partimos de que hay un tamaño muestral global pequeño (13 y 10, respectivamente para el subgrupo 1 y 2), aunque ambos grupos están equilibrados. Esta indicado el MANOVA por contraste de Bartlett de esfericidad, observándose la relación lineal entre las variables dependientes (VDs), por lo que está indicado el multivariable. Se cumple así, el supuesto de linealidad entre variables dependientes.

A continuación observamos que también se cumple el supuesto de independencia de las observaciones. No se ha realizado la prueba de igualdad de las matrices de covarianza de Box porque hay menos de dos matrices de covarianza de casillas no singulares. Este supuesto no debería tener mayor importancia porque los grupos están equilibrados; aún así veremos los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

También podemos ver (Tablas 12 y 13 Apéndice) como a través de la realización de la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* para una muestra, se cumple el supuesto de normalidad en todas las variables dependientes. Además, a

través de la realización del contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas, observamos que tan sólo nos da significativo en dos variables dependientes (mayor de 0,00001), cumpliéndose así este supuesto (Tabla 14 Apéndice). Dado que se cumplen los supuestos de análisis, pasamos al estudio multivariante.

En dicho estudio multivariante analizamos el efecto de cada VI por separado (mom y grupo) y su interacción (mom \* grupo) sobre los vectores de VD (todas las VD consideradas globalmente), observando todo significativo. Elegiríamos la Traza de Pillai por hacer el estadístico más estricto, ya que alguna variable incumple algún supuesto (Tabla 50).

A continuación, vemos el efecto de cada VI y de la interacción por separado para cada VD. Observamos que la VI momento o prepost, es significativa en todas las VDs excepto en Tnl. La interacción mom\*grupo, con diferencias al aplicar conjuntamente ambas variables, es significativa en las VDs: mio, tnt y ldh (en las gráficas se ve en que las líneas no son paralelas) (Tabla 15 Apéndice).

Finalmente realizamos una prueba para ver los efectos inter-sujetos de las variables dependientes, observando que sólo tienen efecto el factor o VI grupo sobre las VDs: MIO, TNT, ACT, y LDH (Tabla 51).

#### **5.4. ESTUDIO 4.**

Realizamos un último estudio para comparar las modificaciones a lo largo del tiempo de los diferentes marcadores en los deportistas de balonmano (subgrupo 1 del grupo C) tras la realización de un test de esfuerzo. La investigación realizada, para dicho estudio, es experimental ya que la variable independiente está manipulada por el investigador.

Dado el conjunto de variables dependientes cuantitativas (6 Variables dependientes) y una variable independientes con cuatro momentos de medida [una VI intrasujeto o medidas repetidas (IS) con 4 niveles o momentos de

medida], podemos decir que se trata de un estudio multivariable (6 VDs), univariable de medidas repetidas (1 VI IS con 4 niveles). En consecuencia tenemos que utilizar para el análisis estadístico MANOVA univariable de medidas repetidas. El tamaño del grupo es el siguiente (N1: 9).

**Variables dependientes:**

- VD<sub>1</sub>: Troponina I (TnI)
- VD<sub>2</sub>: Mioglobina (MIO)
- VD<sub>3</sub>: Troponina T (TnT)
- VD<sub>4</sub>: Actina (ACT)
- VD<sub>5</sub>: CreatinKinasa (CK)
- VD<sub>6</sub>: Lactato dexihidrogenasa (LDH)

**Variable Independiente:**

- **VI<sub>1</sub>: Momento (Intrasujeto o Medidas Repetidas, 4 niveles)**
  - Momento 1, PRE: Antes de Tapiz
  - Momento 2, POST: Después Tapiz
  - Momento 3, POST: Después Tapiz 1 hora
  - Momento 4, POST: Después Tapiz 24 horas

Para poder realizar el análisis MANOVA multivariable tiene que cumplirse los siguientes supuestos de análisis. Partimos de que hay un tamaño muestral global pequeño (9 sujetos), aunque el grupo está equilibrado. Esta indicado el MANOVA por contraste de Bartlett de esfericidad, observándose la relación lineal entre las variables dependientes (VDs), por lo que está indicado el multivariable. Se cumple así el supuesto de linealidad entre variables dependientes (Tabla 16 Apéndice).

A continuación observamos que también se cumple casi en la totalidad de las variables dependientes el supuesto de esfericidad de Mauchly, que lo usamos para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas (Tabla17 Apéndice).

En este estudio multivariante analizamos el efecto intrasujeto y su interacción con el momento (mom \*) sobre los vectores de VD (todas las VD consideradas globalmente) (Tabla 58), observando todo significativo. Elegiríamos la Lambda de Wilks por hacer el estadístico más estricto, ya que alguna variable incumple algún supuesto.

A continuación vemos el efecto de las VDs con el momento, observando significatividad de 4 VDs (mio, tnt, act y Ck) (Tabla 59). Por lo tanto, habría que estudiar las diferencias entre esas cuatro medias (una para cada momento) y ver entre cuales hay diferencias.



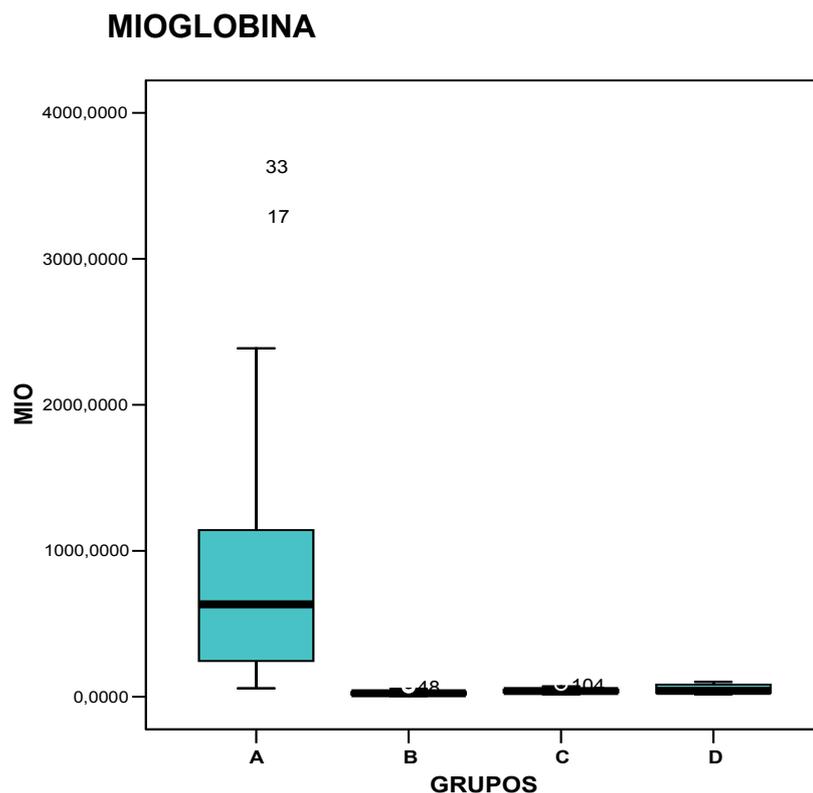
## **V. RESULTADOS**

## 1. ESTUDIO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS DIFERENTES VARIABLES EN LOS CUATRO GRUPOS DE ESTUDIO.

Los resultados reflejados a continuación representan los valores de los diferentes marcadores en condiciones basales, esto es, la determinación en suero de las variables con los sujetos de los distintos grupos en reposo.

### 1.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA MIOGLOBINA

La figura 27 muestra las variaciones en la concentración de mioglobina en suero de los distintos grupos de sujetos. Como se puede observar los sujetos del grupo A presentaron unos niveles de mioglobina mucho más abundantes que los del resto de los grupos.



**FIGURA 27. DIAGRAMA DE CAJAS DE LA MIOGLOBINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS. REPRESENTÁNDOSE LAS MEDIANAS DE CADA GRUPO.**

En la tabla 12 se observa los valores de mioglobina detectados en suero de los diferentes grupos de estudio. En el grupo A, formado por 33 individuos,

los niveles de mioglobina variaron entre 58,6 y 3633 ng/mL, con un valor medio de 891,81 ng/mL y una desviación típica de 887,44. En el grupo B, formado por 33 individuos, los niveles de mioglobina en suero variaron entre 5,7 y 79,8 ng/mL, con un valor medio de 28,8 ng/mL y una desviación típica de 18,9.

DIAGNOSTICO MIOGLOBINA (ng/mL)				
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
<b>Número de sujetos</b>	33	33	48	20
<b>Media</b>	891,815	28,86	41,24	50,23
<b>Error típico de la media</b>	154,48	3,2911	2,16	6,75
<b>Desv. Típ.</b>	887,44	18,90	14,98	30,19
<b>Varianza</b>	787565,73	357,44	224,54	911,98

TABLA 12. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE MIOGLOBINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En el grupo C, formado por 48 sujetos, los niveles de mioglobina variaban entre 16,9 y 81,2 ng/mL, con un valor medio de 41,2 ng/mL y una desviación típica de 14,9. Y en el grupo D, formado por 20 individuos, los niveles de mioglobina variaban entre 16,9y 101,3 ng/mL, con un valor medio de 52,2 ng/mL y una desviación típica de 30,1 ng/mL (Tabla 12).

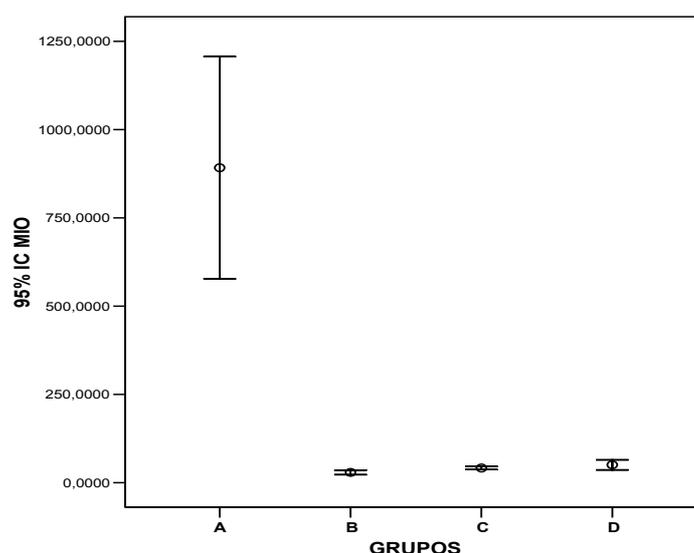


FIGURA 28. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA MIOGLOBINA ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 28 muestra que todos los valores de mioglobina en el grupo A son superiores a los que presentan los grupos B, C y D. Encontramos también niveles más altos en el grupo D que en los grupos B y C.

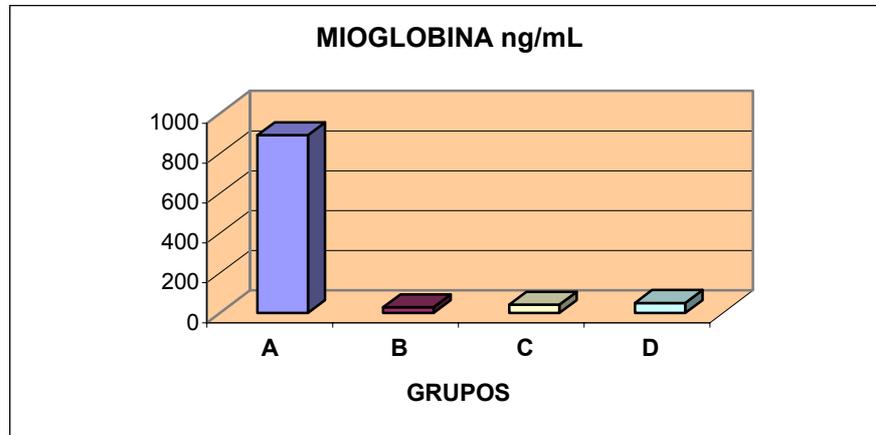


FIGURA 29. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE MIOGLOBINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

En la figura 29 se observan los niveles medios de mioglobina en suero de los sujetos de los diferentes grupos de estudio. Como se puede deducir, el grupo A de pacientes con daño muscular presentan unos niveles medios muy elevados en comparación con el resto de los grupos, donde estos valores medios son muy similares entre ellos

## 1.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN CREATINA FOSFOQUINASA

En la figura 30 se observa como la actividad de CPK en suero del grupo A es mucho más abundante que la del resto de los grupos. Como se puede observar los sujetos del grupo A presentaron unos niveles de CPK mucho más abundantes que los del resto de los grupos. Aunque podemos ver reflejado en la siguiente tabla que las diferencias entre los grupos no son tan amplias con en la anterior variable.

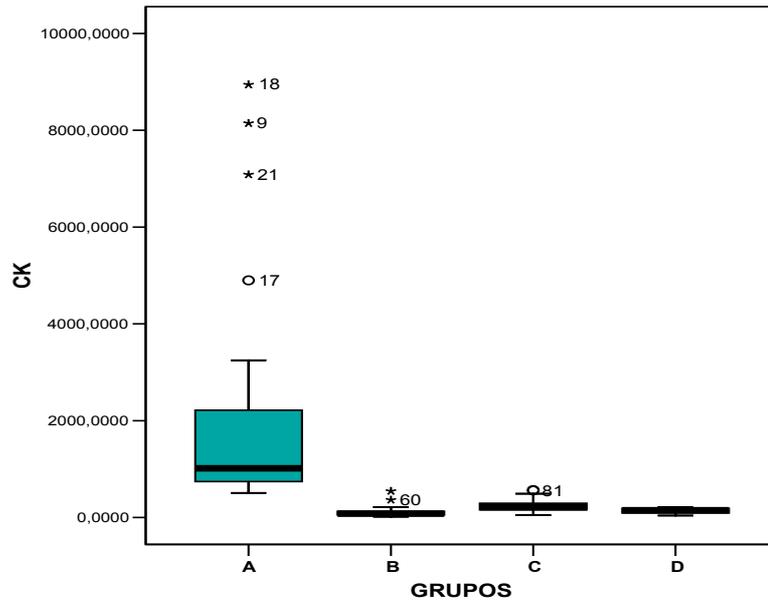


FIGURA 30. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS VALORES DE CPK EN LOS DIFERENTES GRUPOS. REPRESENTANDOSE LAS MEDIANAS DE CADA GRUPO.

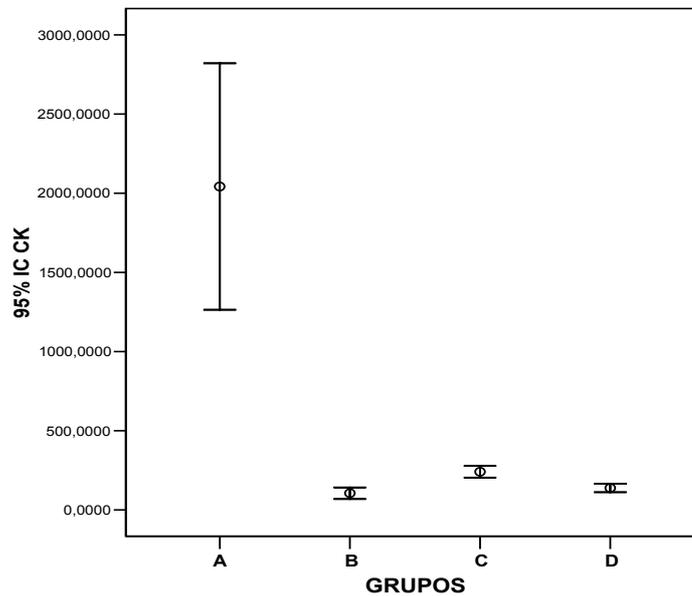
En la tabla 13 se observa los niveles de CPK detectados en suero de los diferentes grupos de estudio. Del grupo A, formado por 33 individuos, la CPK actividad varía entre 509 y 8943 UI/L, con un valor medio de 2041,9 UI/L y una desviación típica de 2194,49 UI/L. En el grupo B, formado por 33 individuos, la actividad de CPK en suero variaba entre 15 y 545 UI/L, con un valor medio de 105,51 UI/L y una desviación típica de 103,9.

DIAGNOSTICO CPK ACTIVIDAD (UI/L)				
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
<b>Número de sujetos</b>	33	33	48	20
<b>Media</b>	2041,93	105,51	240,87	138,3
<b>Error típico de la media</b>	382,01	18,08	17,88	12,68
<b>Desv. Típ.</b>	2194,49	103,90	123,92	56,70
<b>Varianza</b>	4815813,5	10796,38	15356,96	3215,69

TABLA 13. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE CPK EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

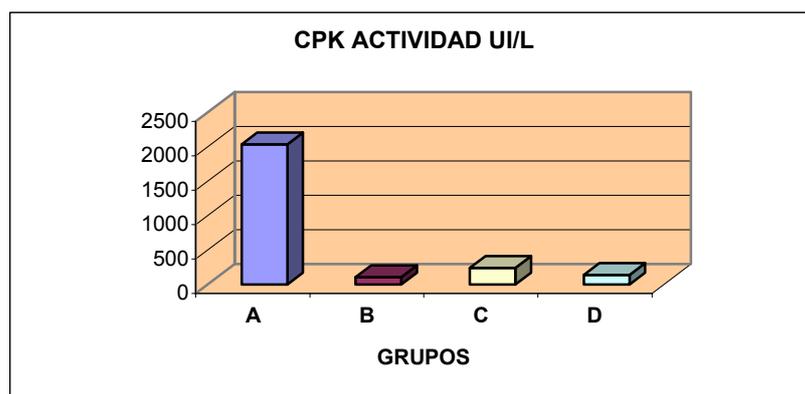
En el grupo C, formado por 48 sujetos, los niveles de CPK variaban entre 46 y 568 UI/L, con un valor medio de 240,8 UI/L y una desviación típica de 123,9. Y en el grupo D, formado por 20 individuos, la actividad de CK

variaba entre 39 y 219 UI/L, con un valor medio de 138,3 UI/L y una desviación típica de 56,7 UI/L (Tabla 13).



**FIGURA 31. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA ACTIVIDAD DE CPK ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.**

La Fig. 31 muestra que todos los valores de CPK Actividad en el grupo A son superiores a los que presentan los grupos B, C y D. La CPK aumenta también más en el grupo C que en los grupos B y D.



**FIGURA 32. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE CPK EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.**

En la figura 32 se observan los niveles medios de CPK en suero de los sujetos de los diferentes grupos de estudio. Como se puede deducir, el grupo A de pacientes con daño muscular presentan unos niveles medios muy elevados en comparación con el resto de los grupos, donde estos valores medios son muy similares entre ellos, siendo un poco más elevados en el grupo C, grupo de deportistas de élite.

### 1.3. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LDH

En la figura 33 se observa como la actividad de LDH en suero del grupo A es más abundante que la del resto de los grupos. Aunque podemos ver reflejado en la siguiente tabla que los grupos C y D tienen concentraciones más altas que los del B.

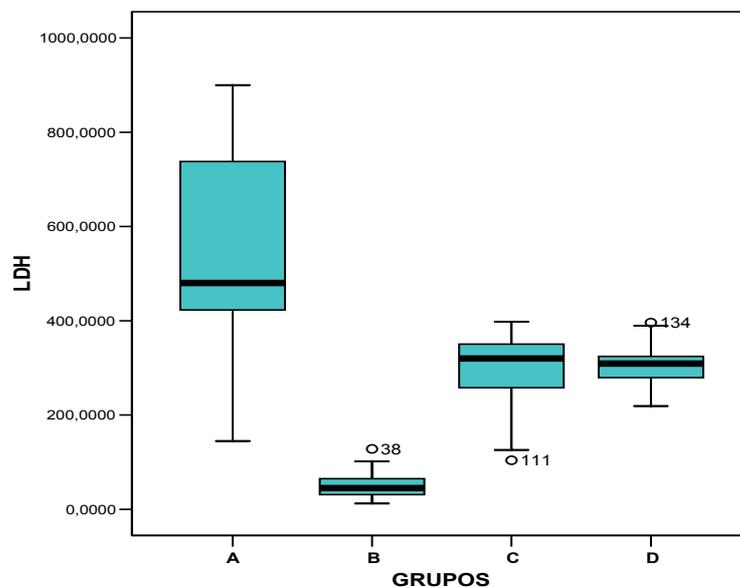


FIGURA 33. DIAGRAMA DE CAJAS ACTIVIDAD DE LDH EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En la tabla 14 se observa los niveles de LDH detectados en suero de los diferentes grupos de estudio. Del grupo A, formado por 33 individuos, la LDH actividad varía entre 145 y 900 UI/L, con un valor medio de 542,21 UI/L y una desviación típica de 203,2 UI/L. En el grupo B, formado por 33 individuos, la actividad de LDH en suero variaba entre 12 y 128 UI/L, con un valor medio de 51,30 UI/L y una desviación típica de 27,08.

DIAGNOSTICO LDH (UI/L)				
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
<b>Número de sujetos</b>	33	33	48	20
<b>Media</b>	542,21	51,30	298,37	304,1
<b>Error típico de la media</b>	35,3	4,71	11,04	11,82
<b>Desv. Típ.</b>	203,2	27,08	76,54	52,86
<b>Varianza</b>	41290,42	733,78	5859,09	2794,30

TABLA 14. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE LDH EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En el grupo C, formado por 48 sujetos, los niveles de LDH variaban entre 104 y 398 UI/L, con un valor medio de 298,3 UI/L y una desviación típica de 76,5. Y en el grupo D, formado por 20 individuos, la actividad de LDH variaba entre 219 y 396 UL/l, con un valor medio de 304,1 UI/L y una desviación típica de 52,8 UI/L (Tabla 14).

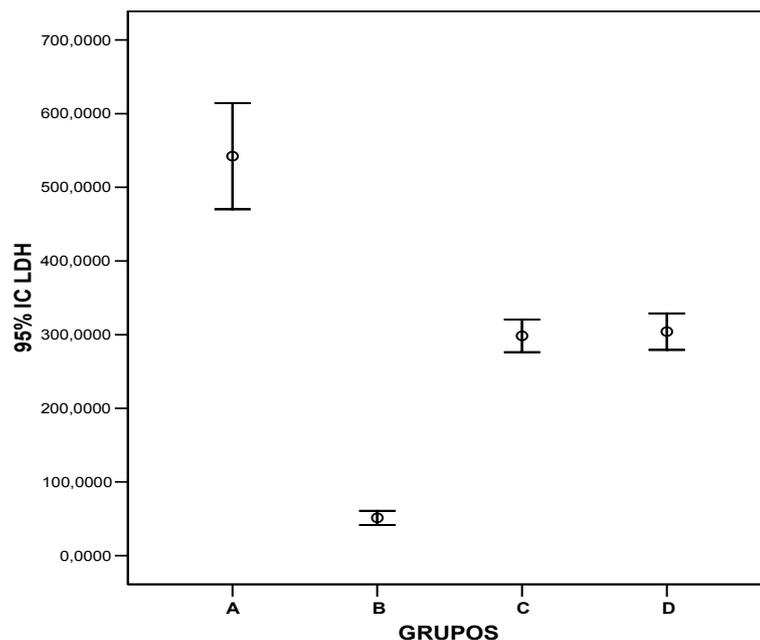
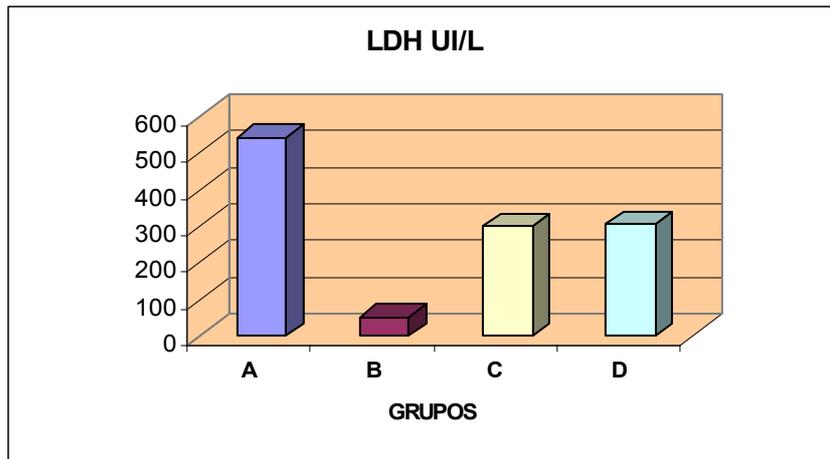


FIGURA 34. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA ACTIVIDAD DE LDH ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 34 muestra que todos los valores de LDH actividad en el grupo A son superiores a los que presentan los grupos B, C y D. La LDH aumenta también más los grupos C y D que en el grupo B.



**FIGURA 35. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE LDH EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.**

En la figura 35 se observan los niveles medios de LDH en suero de los sujetos de los diferentes grupos de estudio. Como se puede deducir, el grupo A de pacientes con daño muscular presentan unos niveles medios muy elevados en comparación con el resto de los grupos, donde estos valores medios son muy similares entre los grupos C y D. Encontrándose la mayor diferencia entre los grupo A y B.

#### **1.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE Tnl.**

En la figura 36 se observa como los niveles de Tnl en suero del grupo A es un poco más abundante que la del resto de los grupos, aunque en este parámetro las diferencias son apenas insignificantes entre los 4 grupos de estudio. Sin embargo podemos ver reflejado en la siguiente tabla que los valores de los grupos tienen concentraciones más similares, aunque se sigue viendo como en el grupo A de sujetos con daño muscular las cantidades son más elevadas que la del resto de grupo.

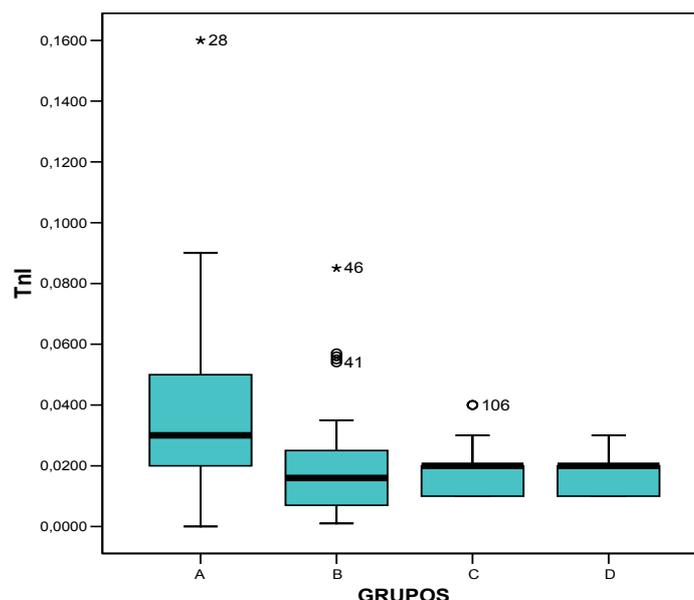


FIGURA 36. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE TnI EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En la tabla 15 se observa la liberación de TnI detectada en suero de los diferentes grupos de estudio. En el grupo A, formado por 33 individuos, la liberación de TnI varía entre 0,00 y 0,16 ng/mL, con un valor medio de 0,03 ng/mL y una desviación típica de 0,031 ng/mL. En el grupo B, formado por 33 individuos, la cantidad de TnI detectada en suero variaba entre 0,001 y 0,08 ng/mL, con un valor medio de 0,021 ng/mL y una desviación típica de 0,01.

DIAGNOSTICO TnI (ng/mL)				
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
<b>Número de sujetos</b>	33	33	48	20
<b>Media</b>	0,03	0,021	0,017	0,016
<b>Error típico de la media</b>	0,005	0,003	0,001	0,001
<b>Desv. Típ.</b>	0,031	0,01	0,008	0,006
<b>Varianza</b>	0,0009	0,0003	0,000	0,000

TABLA 15. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE TnI EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En el grupo C, formado por 48 sujetos, los niveles de TnI detectados en suero de los deportistas variaba entre 0,01 y 0,04 ng/mL, con un valor medio de 0,017 ng/mL y una desviación típica de 0,008. Y en el grupo D, formado por 20 individuos, la cantidad de TnI variaba entre 0,01y 0,03 ng/mL, con un valor medio de 0,016 ng/mL y una desviación típica de 0,006 ng/mL (Tabla 15).

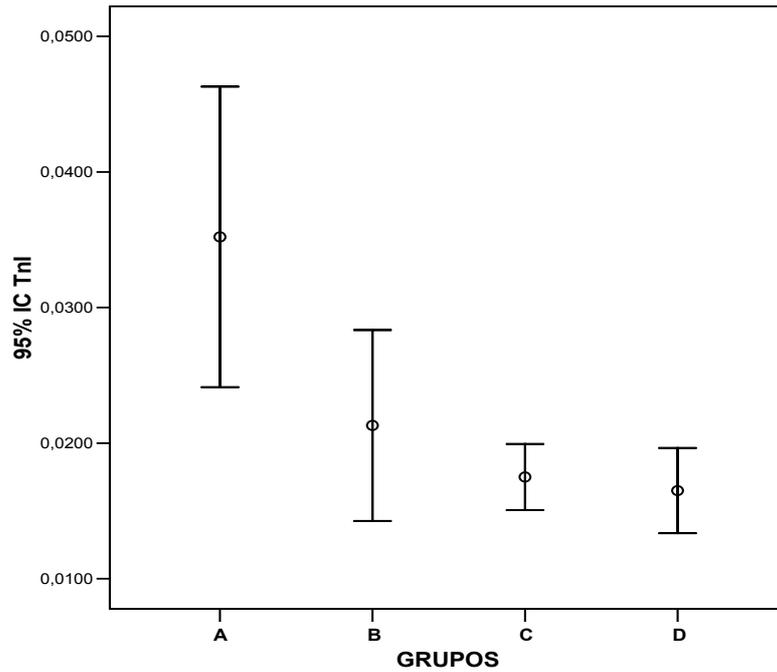


FIGURA 37. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE Tnl ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 37 muestra que los valores de Tnl en el grupo A son superiores a los que presentan los grupos B, C y D. La Tnl aumenta también en el grupo B con respecto a los grupos C y D. Se puede observar que el aumento es muy poco significativo.

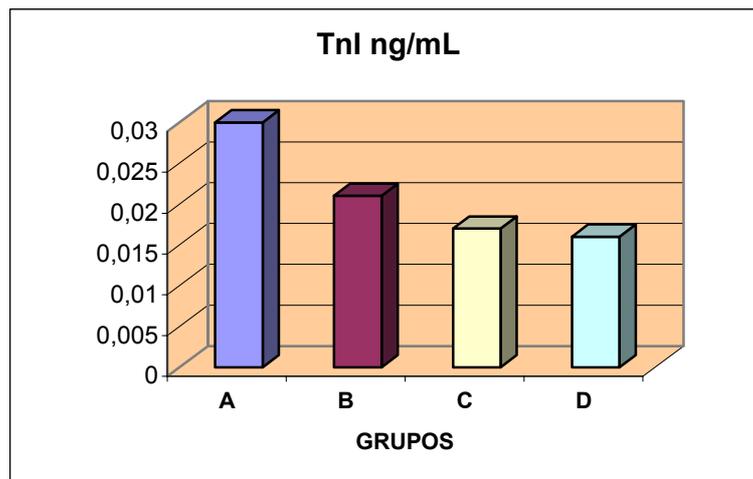


FIGURA 38. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE Tnl EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

En la figura 38 se observan los niveles medios de TnI en suero de los sujetos de los diferentes grupos de estudio. Como se puede deducir, el grupo A de pacientes con daño muscular presentan unos niveles medios un poco más elevados en comparación con el resto de los grupos, siendo estos valores medios muy similares entre los grupos B, C y D.

### 1.5. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnT.

En la figura 39 se observa como los niveles de TnT en suero de los grupos A y D son un poco más abundantes que la de los grupos B y C. Aunque podemos ver reflejado en la siguiente tabla que los valores de los grupos tienen concentraciones más similares, en cambio en esta variable vemos que las distancias de todos los grupos con respecto al grupo A son mucho menores, siendo mayor incluso la concentración de TnT en el grupo D, deportistas lesionados.

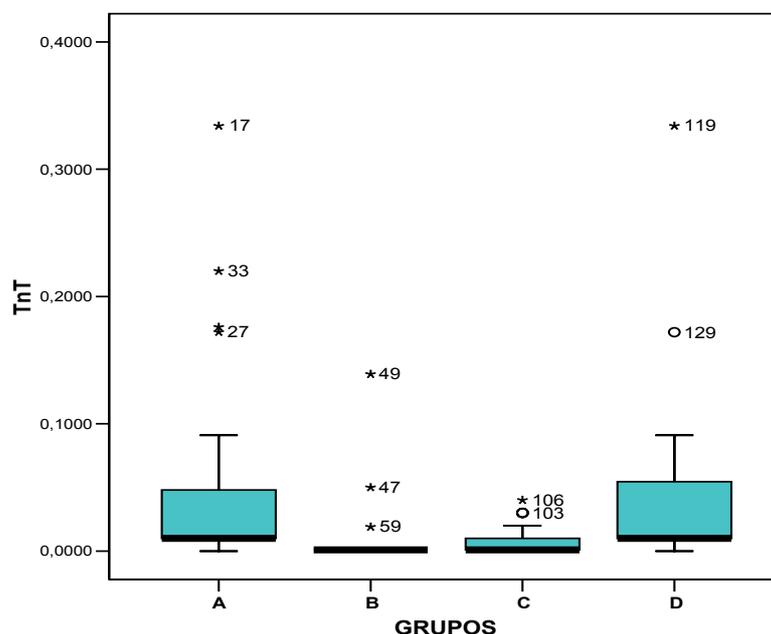


FIGURA 39. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE TnT EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En la tabla 16 se observa la liberación de TnT detectada en suero de los diferentes grupos de estudio. En el grupo A, formado por 33 individuos, la liberación de TnT varía entre 0,00 y 0,33 ng/mL, con un valor medio de 0,0474

ng/mL y una desviación típica de 0,075 ng/mL. En el grupo B, formado por 33 individuos, la cantidad de TnT detectada en suero variaba entre 0,001 y 0,139 ng/mL, con un valor medio de 0,007 ng/mL y una desviación típica de 0,025.

DIAGNOSTICO TnT (ng/mL)				
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
<b>Número de sujetos</b>	33	33	48	20
<b>Media</b>	0,047424	0,00721	0,00731	0,0472
<b>Error típico de la media</b>	0,013	0,004	0,001	0,017
<b>Desv. Típ.</b>	0,075	0,025	0,009	0,079
<b>Varianza</b>	0,005	0,0006	0,000	0,006

TABLA 16. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE TnT EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En el grupo C, formado por 48 sujetos, los niveles de TnT detectados en suero de los deportistas variaba entre 0,001 y 0,04 ng/mL, con un valor medio de 0,007 ng/mL y una desviación típica de 0,009. Y en el grupo D, formado por 20 individuos, la cantidad de TnT variaba entre 0,00 y 0,334 ng/mL, con un valor medio de 0,0472 ng/mL y una desviación típica de 0,079 ng/mL (Tabla 16).

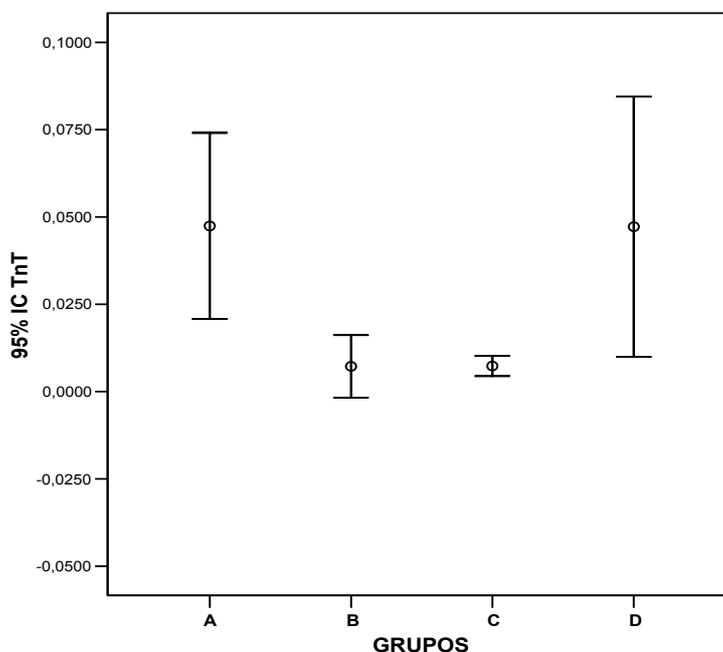
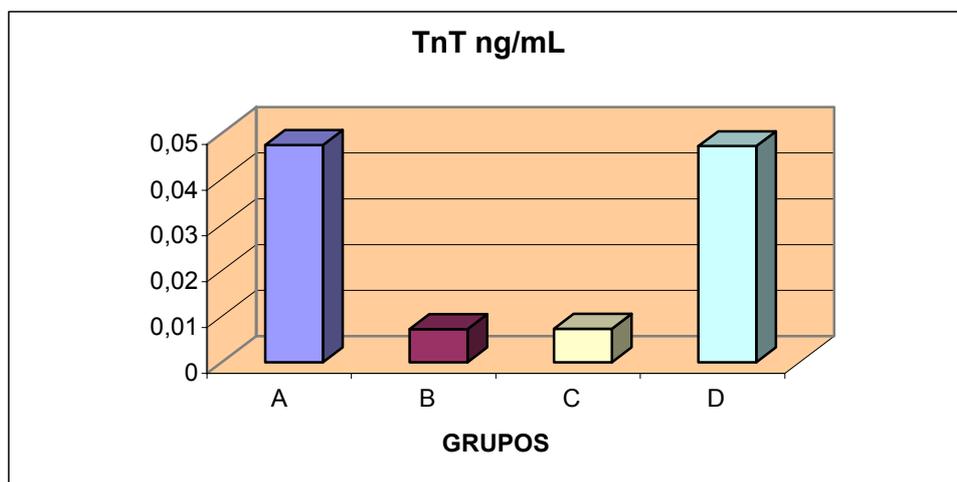


FIGURA 40. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE TnT ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 40 muestra que los valores de TnT en los grupo A y D son superiores a los que presentan los grupos B y C, siendo sus medias muy similares. La TnT aumenta también en el grupo B con respecto al grupo C. Se puede observar que el aumento es muy poco significativo.



**FIGURA 41. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE TnT EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.**

En la figura 41 se observan los niveles medios de TnT en suero de los sujetos de los diferentes grupos de estudio. Como se puede deducir, el grupo A de pacientes con daño muscular y el grupo D de sujetos deportistas lesionados presentan unos niveles medios muy similares y más elevados en comparación con el resto de los grupos. Siendo los valores medios de los grupos B y C muy parecidos entre sí.

#### **1.6. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA-ACTINA.**

En la figura 42 se observa como los niveles de  $\alpha$ -actina en suero del grupo A de sujetos no deportistas con daño muscular esquelético son más abundantes que el del resto de los grupos. Aunque podemos ver reflejado en la siguiente grafica como los valores de  $\alpha$ -actina del grupo D de sujetos deportistas con daño muscular esquelético presentan también valores más amplios que los grupos B y C.

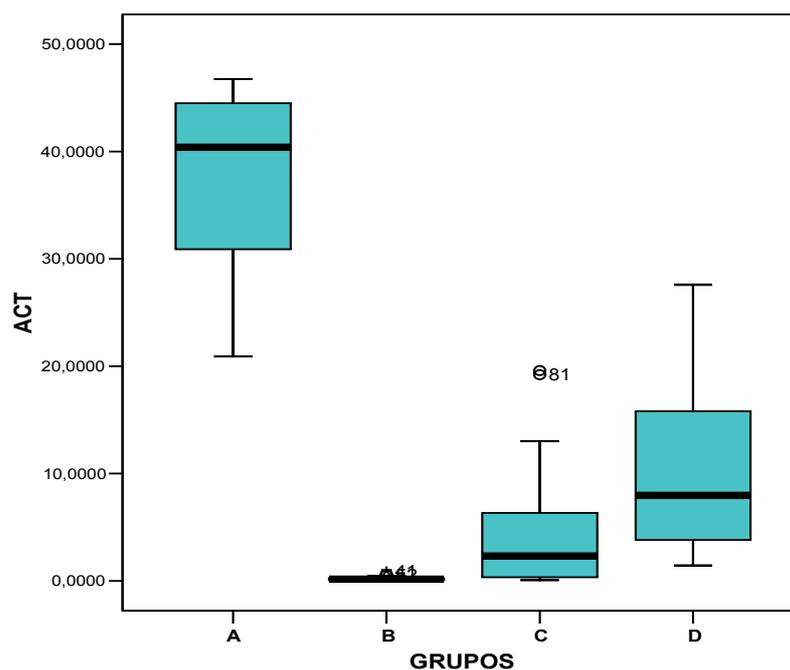


FIGURA 42. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE  $\alpha$ -ACTINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En la tabla 17 se observa la liberación de  $\alpha$ -actina detectada en suero de los diferentes grupos de estudio. En el grupo A, formado por 33 individuos, la liberación de  $\alpha$ -actina varía entre 20,9 y 46,75  $\mu\text{gr/ml}$ , con un valor medio de 37,48  $\mu\text{gr/ml}$  y una desviación típica de 7,67  $\mu\text{gr/ml}$ . En el grupo B, formado por 33 individuos, la cantidad de  $\alpha$ -actina detectada en suero variaba entre 0,01 y 0,92  $\mu\text{gr/ml}$ , con un valor medio de 0,219  $\mu\text{gr/ml}$  y una desviación típica de 0,041.

DIAGNOSTICO $\alpha$ -ACTINA ( $\mu\text{gr/ml}$ )				
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
<b>Número de sujetos</b>	33	33	48	20
<b>Media</b>	37,48	0,219	3,998	10,494
<b>Error típico de la media</b>	1,33	0,035	0,708	1,801
<b>Desv. Típ.</b>	7,67	0,202	4,909	8,057
<b>Varianza</b>	58,87	0,041	24,105	64,930

TABLA 17. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE  $\alpha$ -ACTINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

En el grupo C, formado por 48 sujetos, los niveles de  $\alpha$ -actina detectados en suero de los deportistas variaba entre 0,06 y 19,6  $\mu\text{gr/ml}$ , con un valor medio de 3,998  $\mu\text{gr/ml}$  y una desviación típica de 4,909. Y en el grupo D, formado por 20 individuos, la cantidad de  $\alpha$ -actina variaba entre 1,43 y 27,58  $\mu\text{gr/ml}$ , con un valor medio de 10,494  $\mu\text{gr/ml}$  y una desviación típica de 8,057  $\text{ng/mL}$  (Tabla 17).

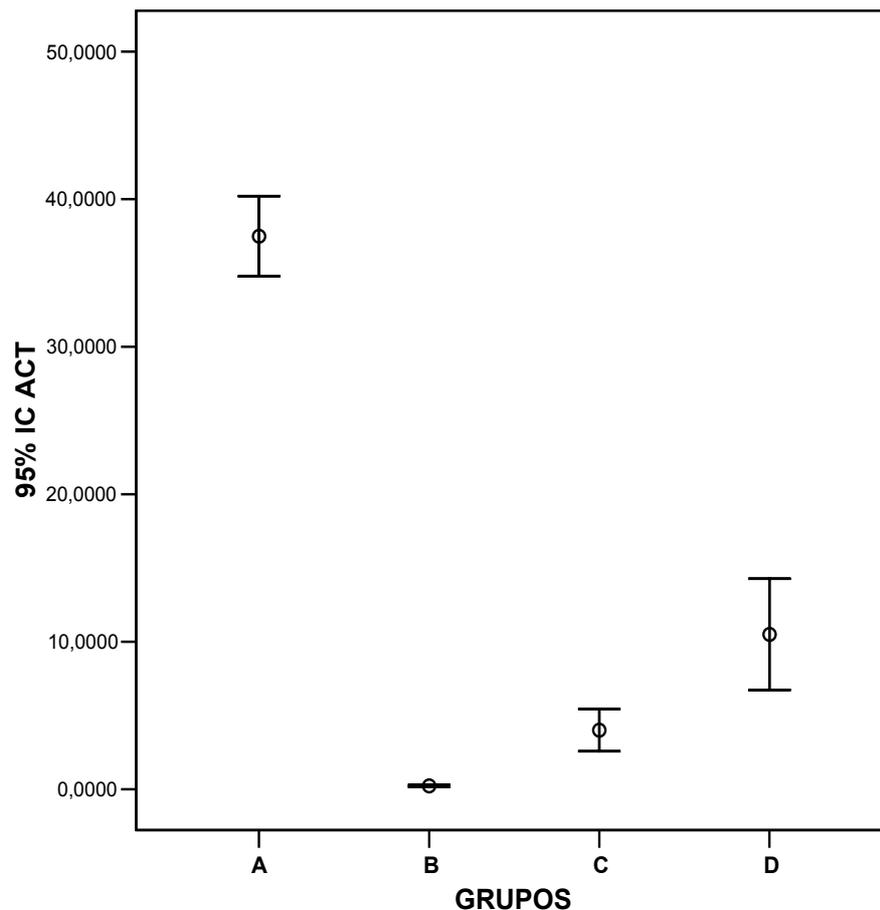


FIGURA 43. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE  $\alpha$ -ACTINA ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 43 muestra que los valores de  $\alpha$ -actina en los grupo A y D son superiores a los que presentan los grupos B y C, siendo los valores del grupo A de sujetos con daño muscular más altos que los del grupo D. La  $\alpha$ -actina aumenta también en el grupo C con respecto al grupo B.

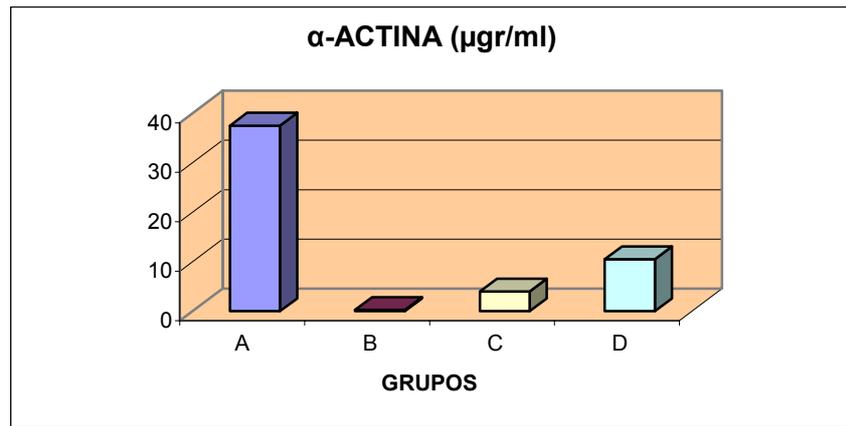


FIGURA 44. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE  $\alpha$ -ACTINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

En la figura 44 se observan los niveles medios de  $\alpha$ -actina en suero de los sujetos de los diferentes grupos de estudio. Como se puede deducir, el grupo A de pacientes con daño muscular y el grupo D de sujetos deportistas lesionados presentan unos niveles más elevados en comparación con el resto de los grupos, siendo sin embargo los niveles  $\alpha$ -actina del grupo A mucho más elevados que del resto de los grupos. Siendo los valores medios de los grupos B y C muy parecidos entre sí.

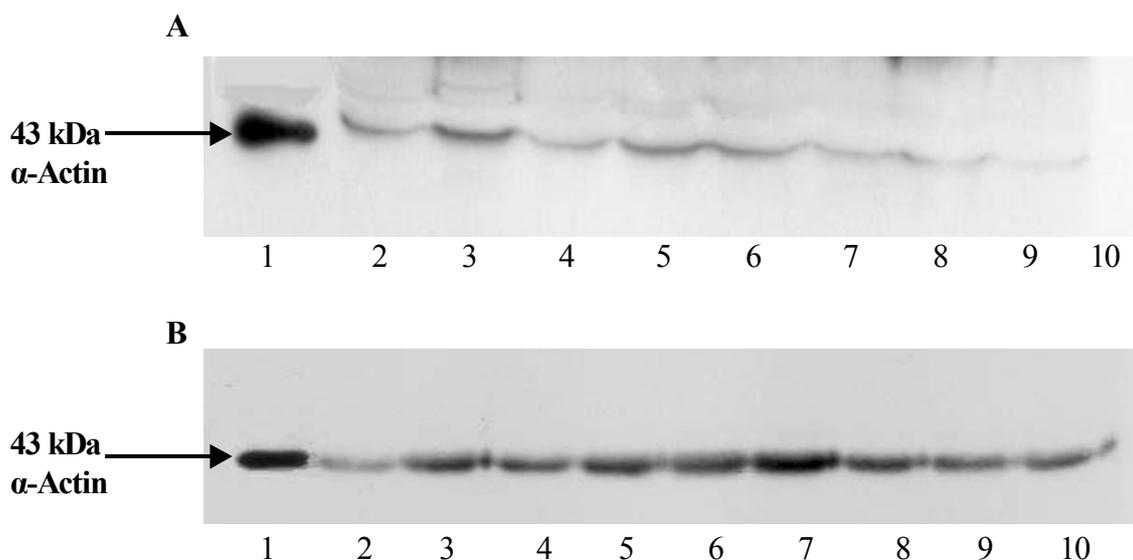


FIGURA 45. A. DETERMINACIÓN POR INMUNOBLOTTING DE LOS NIVELES DE  $\alpha$ -ACTINA EN LOS GRUPOS A Y B.

En la figura 45 la letra **A** representa los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de los sujetos del Grupo B (paciente sanos), con una banda al nivel de 43 kDa. El número 1 se corresponde con el control positivo (80 ng/ $\mu$ l de actina pura) y del número 2 al 10 a los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de sujetos sanos. La letra **B** representa los niveles de  $\alpha$ -actina en el grupo B suero de pacientes con daño muscular esquelético. El número 1 se corresponde con el control positivo (80 ng/ $\mu$ l de actina pura) y del número 2 al 10 a los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de sujetos con daño muscular esquelético.

### 1.7. RESUMEN DE LOS NIVELES DE LAS VARIABLES DENTRO DE CADA GRUPO.

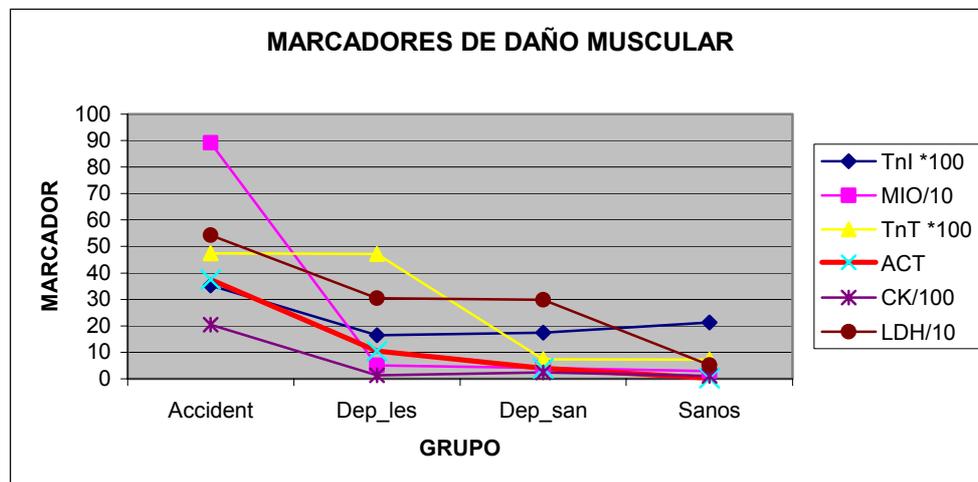


FIGURA 46. NIVELES DE LAS VARIABLES A TRAVÉS DE LOS CUATRO GRUPOS DE ESTUDIO.

En la figura 46 podemos observar la descripción Inicial de los datos, donde está reflejada la media de cada marcador en cada grupo. Los marcadores están reescalados de 0 a 100 para que puedan ser visualmente comparables.

### 1.8.- ANÁLISIS INFERENCIAL DEL ESTUDIO 1

Tras el estudio de los supuestos del Manova y tras comprobar que incumpían gravemente estos se optó para el análisis por una alternativa no paramétrica.

Para la determinación el efecto del grupo sobre cada VD se realizó una análisis de Kruskal-Wallis. Los resultados, que fueron significativos al 1 % para todas las variables se muestran en la siguiente tabla:

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
Chi-cuadrado	12,172	80,861	50,268	102,979	93,951	97,835
gl	3	3	3	3	3	3
Sig. asintót.	,007	,000	,000	,000	,000	,000

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: GR

**TABLA 18. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE (A,B)**

En la tabla 18 analizamos para cada variable dependiente (VD) el efecto de la variable independiente (VI grupo) mediante la *prueba de Kruskal-Wallis*. Observamos que todas las variables dependientes son significativas ( $p < 0.001$ ).

Como encontramos significatividad en el estadístico de contraste para todas las VD realizamos el contraste U-Mann-Whitney por pares de grupos. En las siguientes tablas vemos la significatividad de las variables entre pares de grupo. Observando que en la relación de los grupos de sujetos sanos (B) con daño muscular (A), todas las variables son significativas ( $p < 0.001$ ) (Tabla 19).

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	365,000	3,000	106,000	,000	4,000	,000
W de Wilcoxon	926,000	564,000	667,000	561,000	565,000	561,000
Z	-2,307	-6,945	-5,987	-6,984	-6,932	-6,984
Sig. asintót. (bilateral)	,021	,000	,000	,000	,000	,000

a Variable de agrupación: GR

**TABLA 19. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE. GRUPOS ACCID (A)-CONTROL (B)**

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	461,000	7,000	339,000	,000	8,000	165,000
W de Wilcoxon	1637,000	1183,000	1515,000	1176,000	1184,000	1341,000
Z	-3,298	-7,546	-4,541	-7,613	-7,536	-6,027
Sig. asintót. (bilateral)	,001	,000	,000	,000	,000	,000

a Variable de agrupación: GR

**TABLA 20. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE. GRUPOS ACCID (A)-DEP SANOS (C)**

En la tabla 20 vemos que en la relación de los grupos de daño muscular (A) y deportistas sanos (C) todas las variables son significativas ( $p < 0.001$ ).

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	180,000	12,000	326,000	9,000	,000	63,500
W de Wilcoxon	390,000	222,000	536,000	219,000	210,000	273,500
Z	-2,826	-5,835	-,081	-5,890	-6,055	-4,891
Sig. asintót. (bilateral)	,005	,000	,935	,000	,000	,000

a Variable de agrupación: GR

**TABLA 21. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE. GRUPOS ACCIDENT (A)-DEP LESION (D)**

En la tabla 21 observamos que cuando contrastamos todas las variables entre el grupo de sujetos con daño muscular (A) y el de deportistas lesionados (D) nos dan significatividad a  $p < 0.001$  todas las variables excepto la TnT. En la relación del grupo de sujetos con daño muscular con el de deportistas sanos, todas las variables son significativas para  $p < 0.001$  excepto la Tnl que no es estadísticamente significativa (Tabla 22).

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	781,000	415,500	583,500	233,000	214,500	2,000
W de Wilcoxon	1342,000	976,500	1144,500	794,000	775,500	563,000
Z	-,108	-3,619	-2,603	-5,374	-5,551	-7,594
Sig. asintót. (bilateral)	,914	,000	,009	,000	,000	,000

a Variable de agrupación: GR

**TABLA 22. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE. GRUPOS ACCIDENT (A) -DEP SANOS (C)**

En la tabla 23 vemos como la relación del grupo control con el de deportistas lesionados, todas las variables son significativas para  $p < 0.001$  excepto la Tnl que no es estadísticamente significativa.

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	326,500	172,000	76,000	,000	176,500	,000
W de Wilcoxon	536,500	733,000	637,000	561,000	737,500	561,000
Z	-,065	-2,899	-5,179	-6,056	-2,817	-6,056
Sig. asintót. (bilateral)	,948	,004	,000,	,000	,005	,000

a Variable de agrupación: GR

**TABLA 23. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE. GRUPOS CONTROL (B)-DEP LESIONADOS (D)**

Por último, en la tabla 24 vemos como la relación del grupo deportistas sanos (C)) con el de deportistas lesionados, que tan sólo las variables TnT, ACT y CK son significativas para  $p < 0.001$  no siendo significativas la Tnl, mioglobina y LDH.

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	464,000	448,500	216,000	199,000	218,000	446,000
W de Wilcoxon	674,000	1624,500	1392,000	1375,000	428,000	656,000
Z	-,235	-,424	-3,751	-3,782	-3,527	-,458
Sig. asintót. (bilateral)	,814	,672	,000	,000	,000	,647

a Variable de agrupación: GR

T

**TABLA 24. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE. GRUPOS DEP SANOS (C)-DEP LES (D)**

A continuación analizaremos los pares de grupos dos a dos mediante la prueba estadístico de contraste para cada variable dependiente, para ver la significatividad de cada variable (contrastes Post-Hoc o a posteriori)

<b>MIO</b>	Accident A	Dep_les D	Dep_san C	Sanos B
Accident (A)		<b>0,0001**</b>	<b>0,0001**</b>	<b>0,0001**</b>
Dep_les (D)			<b>0,770</b>	<b>0,048*</b>
Dep_san (C)				<b>0,016*</b>
Sanos (B)				

**TABLA 25. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE TNI.**

En la tabla 25 observamos la significatividad de la variable dependiente mioglobina con los cuatro grupos de estudio (Grupos A, B, C y D). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la mioglobina entre los grupos deportistas lesionados (D) y grupo de daño muscular (A). También se ven diferencias significativas en la mioglobina entre estos grupo de estudio (C-A), (B-A) y (B-C).

<b>CK</b>	Accident A	Dep_les D	Dep_san C	Sanos B
Accident (A)		<b>0,0001**</b>	<b>0,0001**</b>	<b>0,0001**</b>
Dep_les (D)			<b>0,0001**</b>	<b>0,005**</b>
Dep_san (C)				<b>0,0001**</b>
Sanos (B)				

**TABLA 26. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE CK.**

En la tabla 26 observamos la significatividad de la variable dependiente CK con los cuatro grupos de estudio (Grupos A, B, C y D). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la CK entre los grupos deportistas lesionados (D) y grupo de daño muscular (A). También se ven diferencias significativas entre el resto de comparaciones de grupos, siendo la relación entre grupos la siguiente (C-A), (C-D), (B-A), (B-D) y (B-C).

<b>LDH</b>	<b>Accident A</b>	<b>Dep_les D</b>	<b>Dep_san C</b>	<b>Sanos B</b>
<b>Accident (A)</b>		<b>0,0001**</b>	<b>0,0001**</b>	<b>0,0001**</b>
<b>Dep_les (D)</b>			<b>0,647</b>	<b>0,0001**</b>
<b>Dep_san (C)</b>				<b>0,0001**</b>
<b>Sanos (B)</b>				

TABLA 27. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE LDH.

En la tabla 27 observamos la significatividad de la variable dependiente LDH con los cuatro grupos de estudio (Grupos A, B, C y D). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la LDH entre los grupos deportistas lesionados (D) y grupo de daño muscular (A). También se ven diferencias significativas en la LDH entre estos grupo de estudio (C-A), (B-A), (B-D) y (B-C).

<b>TnI</b>	<b>Accident A</b>	<b>Dep_les D</b>	<b>Dep_san C</b>	<b>Sanos B</b>
<b>Accident (A)</b>		<b>0,021</b>	<b>0,001**</b>	<b>0,195</b>
<b>Dep_les (D)</b>			<b>0,814</b>	<b>0,756</b>
<b>Dep_san (C)</b>				<b>0,914</b>
<b>Sanos (B)</b>				

TABLA 28. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE TnI.

En la tabla 28 observamos la significatividad de la variable dependiente TnI con los cuatro grupos de estudio (Grupos A, B, C y D). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la TnI entre los grupos deportistas sanos (C) y grupo de daño muscular (A). No observándose mas diferencias significativas en la TnI entre la relación de los demás grupos de estudio.

<b>TnT</b>	<b>Accident A</b>	<b>Dep_les D</b>	<b>Dep_san C</b>	<b>Sanos B</b>
Accident (A)		0,935	0,0001**	0,0001**
Dep_les (D)			0,0001**	0,0001**
Dep_san (C)				0,009**
Sanos (B)				

TABLA 29. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE TNT.

En la tabla 29 observamos la significatividad de la variable dependiente TnT con los cuatro grupos de estudio (Grupos A, B, C y D). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la TnT entre los grupos deportistas sanos (C) y grupo de daño muscular (A). También se ven diferencias significativas en la TnT entre estos grupo de estudio (C-D), (B-A), (B-D) y (B-C).

<b>ACT</b>	<b>Accident A</b>	<b>Dep_les D</b>	<b>Dep_san C</b>	<b>Sanos B</b>
Accident (A)		0,0001**	0,0001**	0,0001**
Dep_les (D)			0,0001**	0,0001**
Dep_san (C)				0,0001**
Sanos (B)				

TABLA 30. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE ACTINA.

En la tabla 30 observamos la significatividad de la variable dependiente actina con los cuatro grupos de estudio (Grupos A, B, C y D). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la actina entre los grupos deportistas lesionados (D) y grupo de daño muscular (A). También se ven diferencias significativas en la actina entre todas las demás relaciones entre grupos (C-A), (C-D), (B-A), (B-D) y (B-C).

## 2. ESTUDIO 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS (SUB 1, SUB 2 Y SUB 3).

Los resultados reflejados a continuación representan los valores de los diferentes marcadores en condiciones basales, esto es, la determinación en suero de las variables con los sujetos de los distintos subgrupos en reposo.

## 2.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE MIOGLOBINA

La figura 47 muestra las variaciones en la concentración de mioglobina en suero de los distintos subgrupos (Sub.1 grupo deportistas de balonmano, Sub.2 deportistas de rugby y Sub.3 deportes individuales) de sujetos. Como se puede observar los sujetos del grupo A presentaron unos niveles de mioglobina mucho más abundantes que los del resto de los grupos.

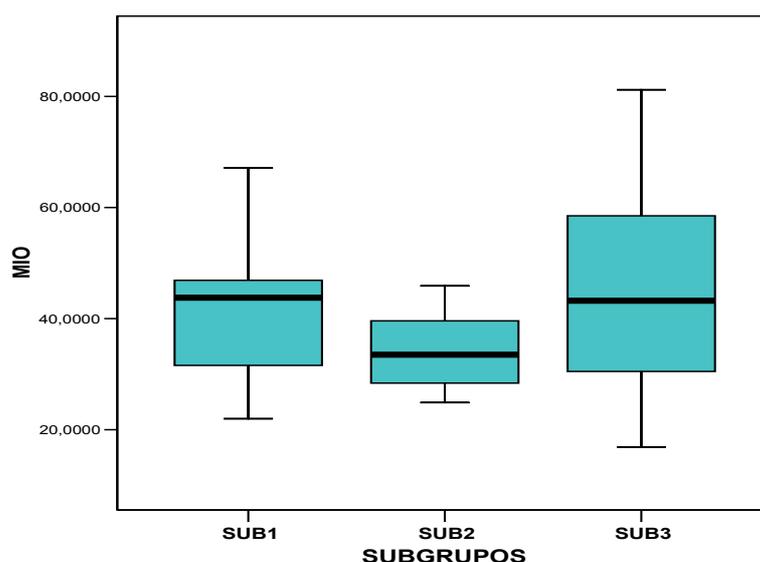


FIGURA 47. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE MIOGLOBINA EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En la tabla 31 se observa los valores de mioglobina detectados en suero de los diferentes grupos de estudio. En el subgrupo 1, formado por 16 individuos, los niveles de mioglobina variaron entre 22 y 67,1 ng/mL, con un valor medio de 40,85 ng/mL y una desviación típica de 12,60. En el subgrupo 2, formado por 10 individuos, los niveles de mioglobina en suero variaron entre 24,9 y 45,9 ng/mL, con un valor medio de 34,23 ng/mL y una desviación típica de 18,56.

En el subgrupo 3, formado por 17 sujetos, los niveles de mioglobina variaban entre 16,9 y 81,2 ng/mL, con un valor medio de 45,54 ng/mL y una desviación típica de 18,56 (Tabla 31).

DIAGNOSTICO MIOGLOBINA (ng/mL)			
	SUBGRUPO 1	SUBGRUPO 2	SUBGRUPO 3
Número de sujetos	16	10	17
Media	40,85	34,23	45,54
Error típico de la media	3,150	2,158	4,50
Desv. Típ.	12,60	6,824	18,56
Varianza	158,81	46,571	344,48

TABLA 31. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE MIOGLOBINA EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

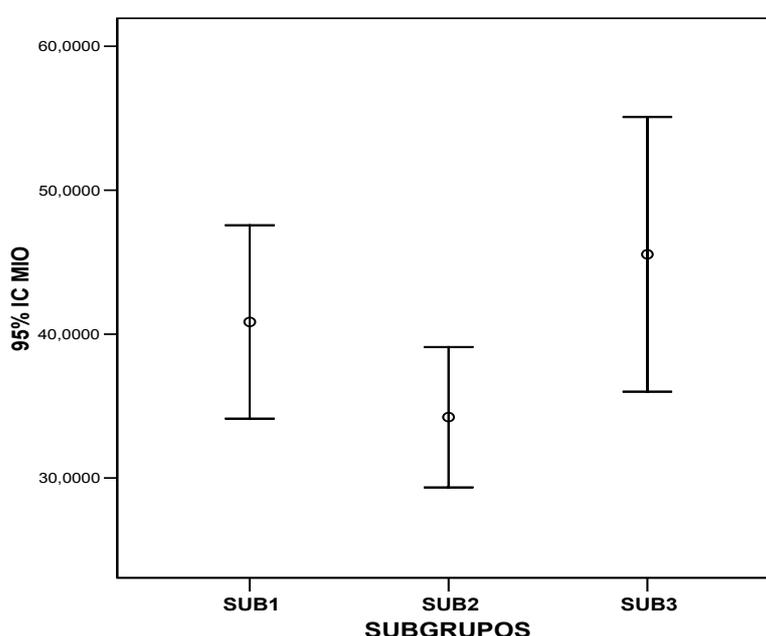


FIGURA 48. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE MIOGLOBINA ENTRE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 48 muestra que todos los valores de mioglobina en el subgrupo 3 son superiores a los que presentan los subgrupos 1 y 2.

En la figura 49 se observan los niveles medios de mioglobina en suero de los sujetos de los diferentes subgrupos de estudio. Como se puede deducir, el subgrupo 3 de deportistas de deportes individuales presentan unos niveles medios más elevados en comparación con el resto de los subgrupos, aunque las diferencias son mínimas en sus valores medios.

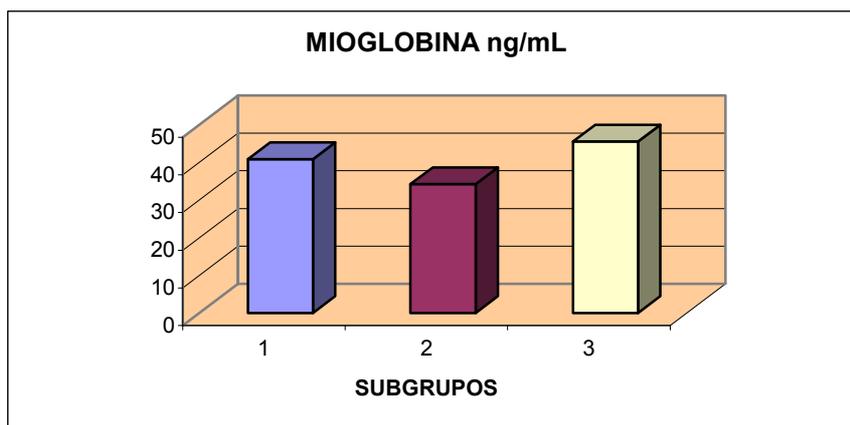


FIGURA 49. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE MIOGLOBINA EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.

## 2.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE CREATINA FOSFOQUINASA

La figura 50 muestra las variaciones en la concentración de mioglobina en suero de los distintos subgrupos (Sub.1 grupo deportistas de balonmano, Sub.2 deportistas de rugby y Sub.3 deportes individuales) de sujetos. Como se puede observar los sujetos del grupo A presentaron unos niveles de mioglobina mucho más abundantes que los del resto de los grupos.

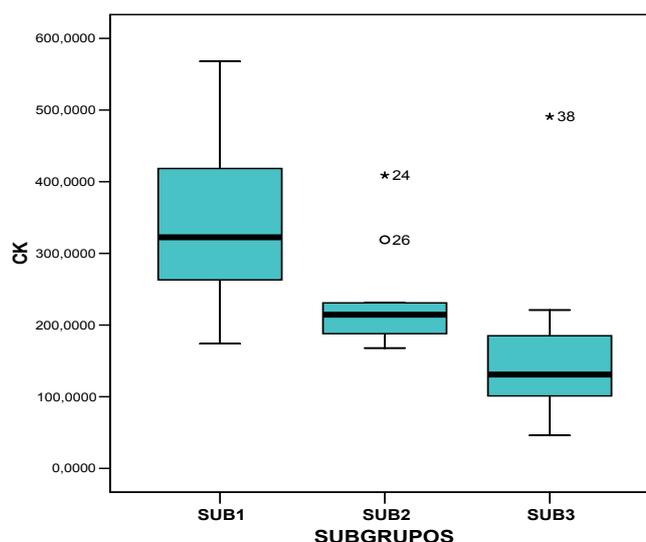


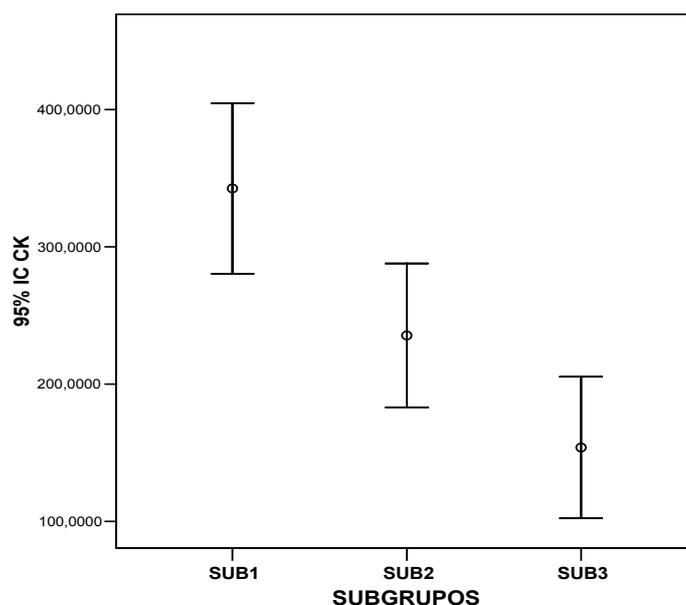
FIGURA 50. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE CPK EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En la tabla 32 se observa los niveles de CPK detectados en suero de los diferentes subgrupos de estudio. Del subgrupo 1, formado por 16 deportistas, la CPK actividad varía entre 174 y 568 UI/L, con un valor medio de 342,5 UI/L y una desviación típica de 116,53 UI/L. En el subgrupo 2, formado por 10 deportistas, la actividad de CPK en suero variaba entre 168 y 409 UI/L, con un valor medio de 235,4 UI/L y una desviación típica de 73,3.

DIAGNOSTICO CPK ACTIVIDAD (UI/L)			
	SUBGRUPO 1	SUBGRUPO 2	SUBGRUPO 3
<b>Número de sujetos</b>	16	10	17
<b>Media</b>	342,5	235,4	153,76
<b>Error típico de la media</b>	29,13	23,18	24,32
<b>Desv. Típ.</b>	116,53	73,33	100,28
<b>Varianza</b>	13581,06	5377,6	10057,56

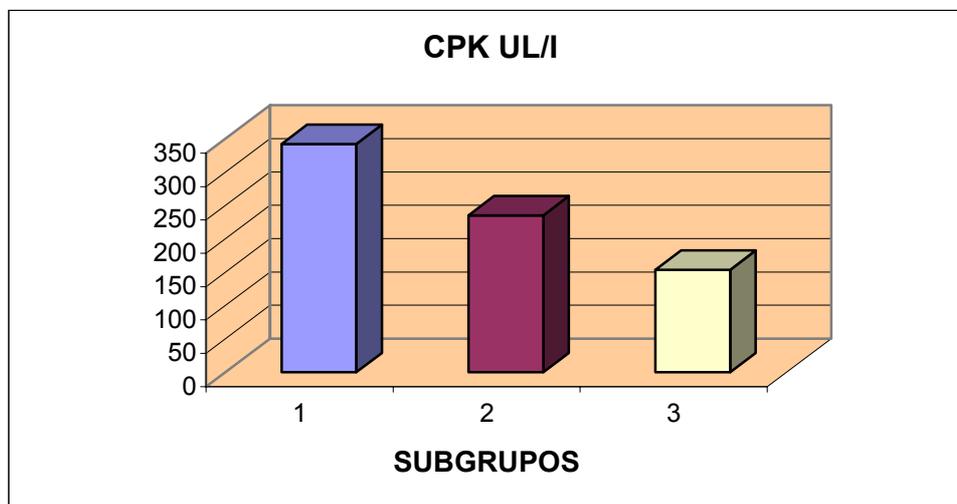
**TABLA 32. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE CPK ACTIVIDAD EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.**

En el subgrupo 3, formado por 17 deportistas, los niveles de CPK variaban entre 46 y 491 UI/L, con un valor medio de 153,7 UI/L y una desviación típica de 100,2 (Tabla 32).



**FIGURA 52. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE CPK ACTIVIDAD ENTRE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.**

La Fig. 52 muestra que los valores de CPK detectados en suero de deportistas del subgrupo 1 son superiores a los que presentan los subgrupos 2 y 3.



**FIGURA 53. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE CPK EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.**

En la figura 53 se observan los niveles medios de CPK actividad en suero de los sujetos de los diferentes subgrupos de estudio. Como se puede deducir, el subgrupo 1 de deportistas de balonmano presentan unos niveles medios más elevados en comparación con el resto de los subgrupos.

### **2.3. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LDH.**

En la figura 54 se observa como la actividad de LDH en suero del subgrupo 2 es más abundante que la del resto de los grupos. Aunque podemos ver reflejado en la siguiente tabla que el subgrupo 1 tiene concentraciones más altas que los deportistas del subgrupo 3. En esta grafica se ven reflejados los valores de la mediana de la variable analizada y su variación en cada grupo estudiado.

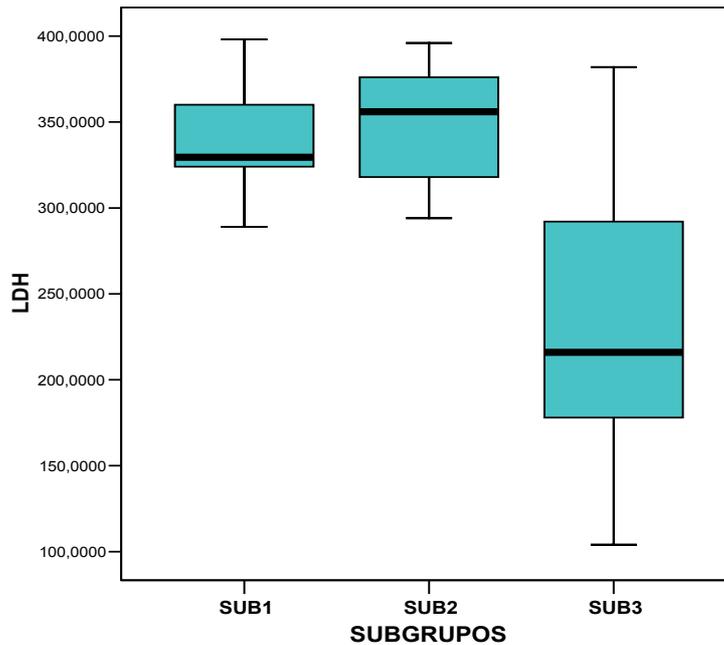


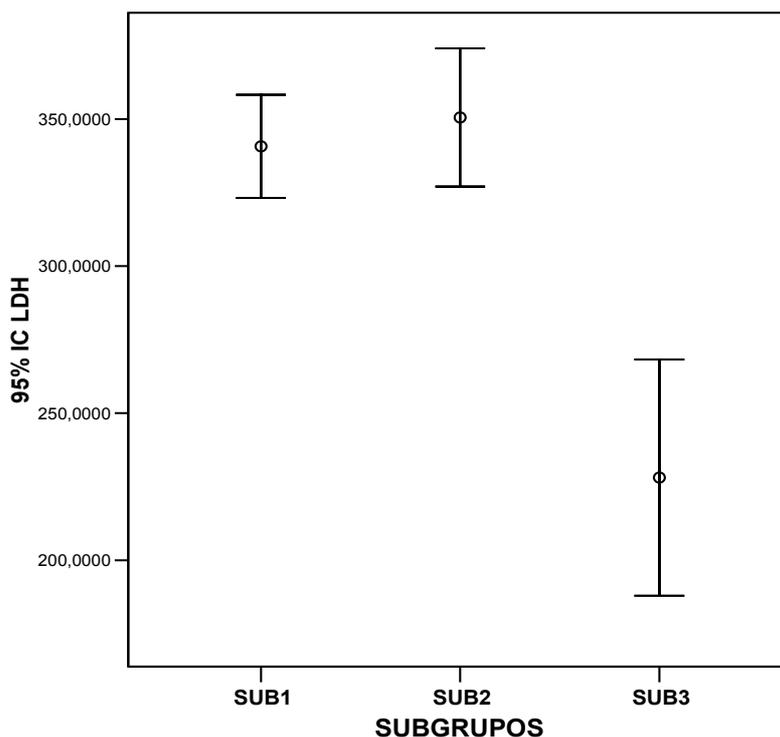
FIGURA 54. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE LDH EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En la tabla 33 se observa los niveles de LDH detectados en suero de los diferentes subgrupos de estudio. Del subgrupo 1, formado por 16 deportistas, la LDH actividad varía entre 289 y 398 UI/L, con un valor medio de 340,68 UI/L y una desviación típica de 32,8 UI/L. En el subgrupo 2, formado por 10 deportistas, la actividad de LDH en suero variaba entre 294 y 396 UI/L, con un valor medio de 350,5 UI/L y una desviación típica de 32,81.

DIAGNOSTICO LDH (UI/L)			
	SUBGRUPO 1	SUBGRUPO 2	SUBGRUPO 3
<b>Número de sujetos</b>	16	10	17
<b>Media</b>	340,68	350,5	228,11
<b>Error típico de la media</b>	8,21	10,37	18,94
<b>Desv. Típ.</b>	32,86	32,81	78,12
<b>Varianza</b>	1079,82	1076,72	6103,86

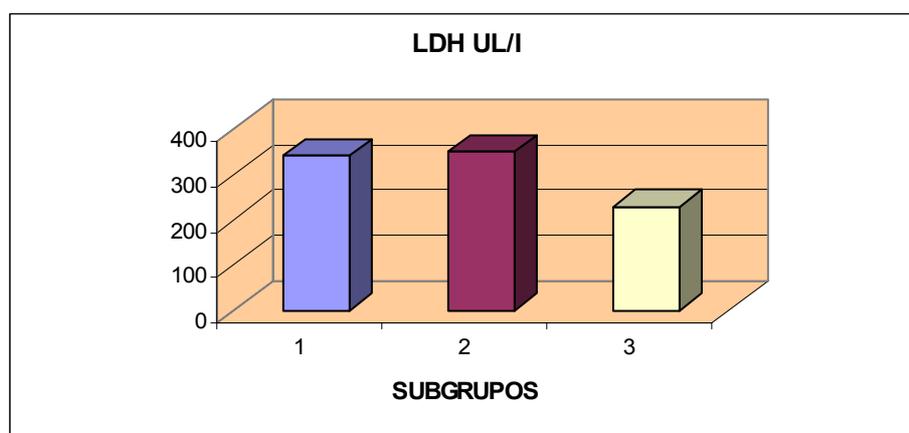
TABLA 33. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE LDH EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En el subgrupo 3, formado por 17 deportistas, los niveles de LDH variaban entre 104 y 382 UI/L, con un valor medio de 228,1 UI/L y una desviación típica de 78,12 (Tabla 33).



**FIGURA 55. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE LDH ACTIVIDAD ENTRE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.**

La Fig. 55 muestra que los valores de LDH detectados en suero de deportistas del subgrupo 2 son superiores a los que presentan los subgrupos 2 y 3. Siendo los valores del subgrupo 3 de deportes individuales más bajos que los del subgrupo 1.



**FIGURA 56. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE LDH EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.**

En la figura 56 se observan los niveles medios de LDH actividad en suero de los deportistas de los diferentes subgrupos de estudio. Como se puede deducir, los subgrupos 1 y 2 de deportistas de balonmano y rugby respectivamente presentan unos niveles medios más elevados en comparación con el subgrupo 3.

#### 2.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE Tnl.

En la figura 57 se observa como los niveles de Tnl en suero de los tres subgrupos es muy similar. Siendo los valores detectados de Tnl, en el suero de los deportistas de todos los subgrupos, prácticamente los mismos.

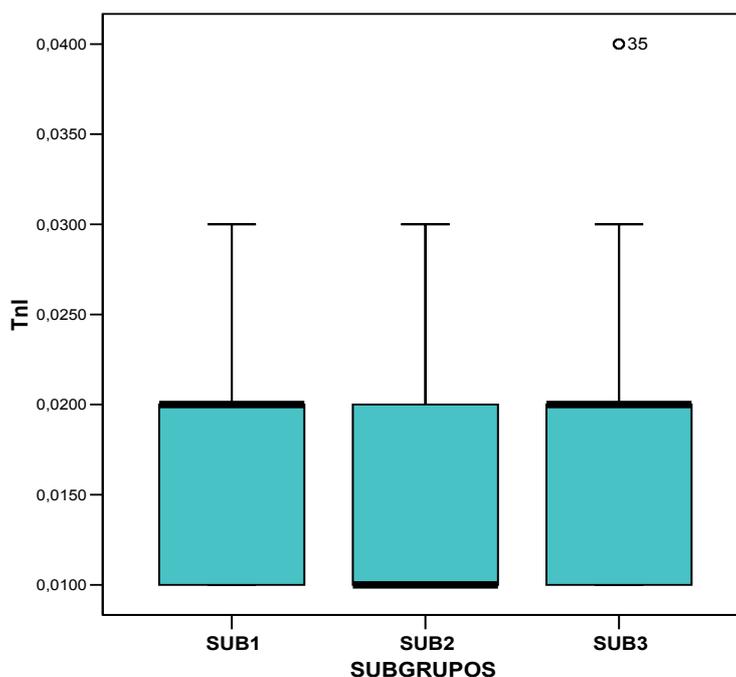


FIGURA 57. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE Tnl EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En la tabla 34 se observa los niveles de Tnl detectados en suero de los diferentes subgrupos de estudio. Del subgrupo 1, formado por 16 deportistas, la Tnl varía entre 0,01 y 0,03 ng/mL, con un valor medio de 0,0175 ng/mL y una desviación típica de 0,0068 ng/mL. En el subgrupo 2, formado por 10 deportistas, los niveles de Tnl en suero variaron entre 0,01 y 0,03 ng/mL, con un valor medio de 0,016 ng/mL y una desviación típica de 0,008.

DIAGNOSTICO TnI (ng/mL)			
	SUBGRUPO 1	SUBGRUPO 2	SUBGRUPO 3
Número de sujetos	16	10	17
Media	0,0175	0,016	0,0188
Error típico de la media	0,0017	0,002	0,0024
Desv. Típ.	0,0068	0,0084	0,0099
Varianza	0,000	0,000	0,000

TABLA 34. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE LDH EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En el subgrupo 3, formado por 17 deportistas, los niveles de TnI variaron entre 0,01 y 0,04 ng/mL, con un valor medio de 0,018 ng/mL y una desviación típica de 0,009 (Tabla 34).

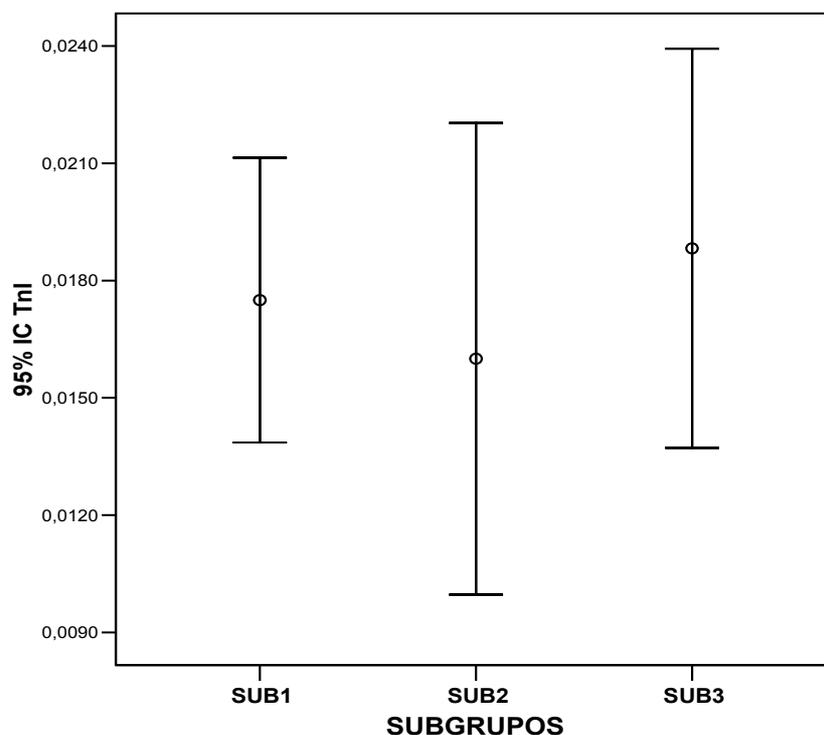
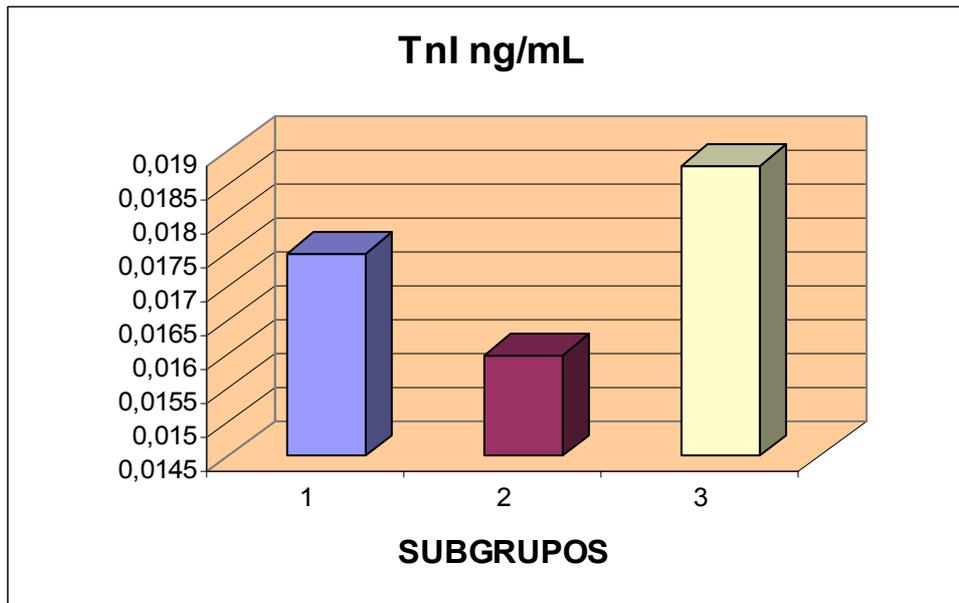


FIGURA 58 DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE TnI ENTRE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 58 muestra que los valores de TnI detectados en suero de deportistas del subgrupo 3 son levemente superiores a los que presentan los subgrupos 1 y 2. Siendo los valores del subgrupo 1 de deportistas de balonmano más bajos que el del resto de subgrupos.



**FIGURA 59. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE TnI EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.**

En la figura 59 se observan los niveles medios de TnI en suero de los deportistas de los diferentes subgrupos de estudio. Como se puede deducir, los subgrupos 1 y 2 de deportistas de balonmano y rugby respectivamente presentan unos niveles medios más bajos en comparación con el subgrupo 3.

## **2.5. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnT.**

En la figura 60 se observa como los niveles detectados de TnT en suero del subgrupo 3 es más abundante que la del resto de los subgrupos. Viéndose reflejado en la siguiente tabla que el subgrupo 1 y 2 tiene concentraciones más o menos similares. En esta grafica se ven reflejados los valores de la mediana de la variable analizada y su variación en cada grupo estudiado. Observándose también claramente las dispersión de los datos y los valores que se salen de lo normal.

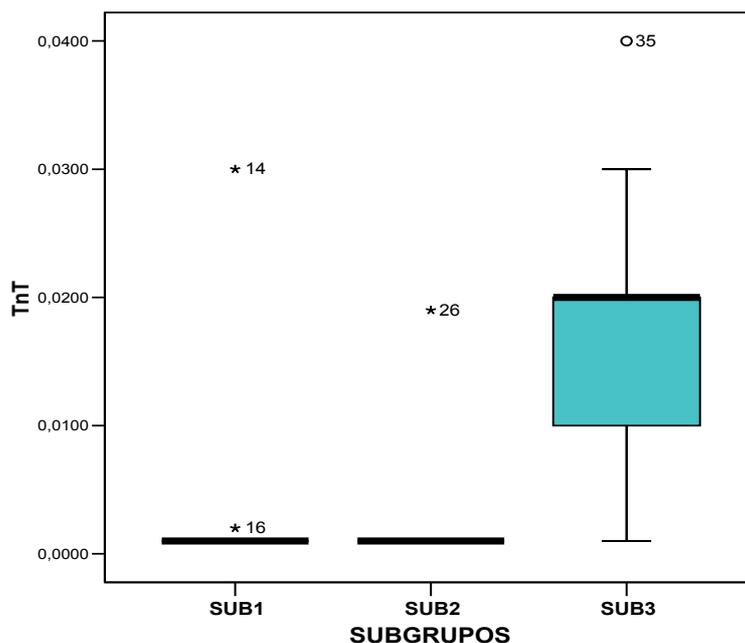


FIGURA 60. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE TnT EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En la tabla 35 se observa los niveles de TnT detectados en suero de los diferentes subgrupos de estudio. Del subgrupo 1, formado por 16 deportistas, la TnT varía entre 0,001 y 0,03 ng/mL, con un valor medio de 0,0028 ng/mL y una desviación típica de 0,007 ng/mL. En el subgrupo 2, formado por 10 deportistas, los niveles de TnT en suero variaron entre 0,001 y 0,019 ng/mL, con un valor medio de 0,002 ng/mL y una desviación típica de 0,005.

DIAGNOSTICO TnT (ng/mL)			
	SUBGRUPO 1	SUBGRUPO 2	SUBGRUPO 3
<b>Número de sujetos</b>	16	10	17
<b>Media</b>	0,0028	0,0028	0,016
<b>Error típico de la media</b>	0,0018	0,0018	0,0023
<b>Desv. Típ.</b>	0,0072	0,0056	0,0098
<b>Varianza</b>	0,000	0,000	0,000

TABLA 35. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE LDH EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En el subgrupo 3, formado por 17 deportistas, los niveles de TnT variaron entre 0,001 y 0,04 ng/mL, con un valor medio de 0,016 ng/mL y una desviación típica de 0,009 (Tabla 35).

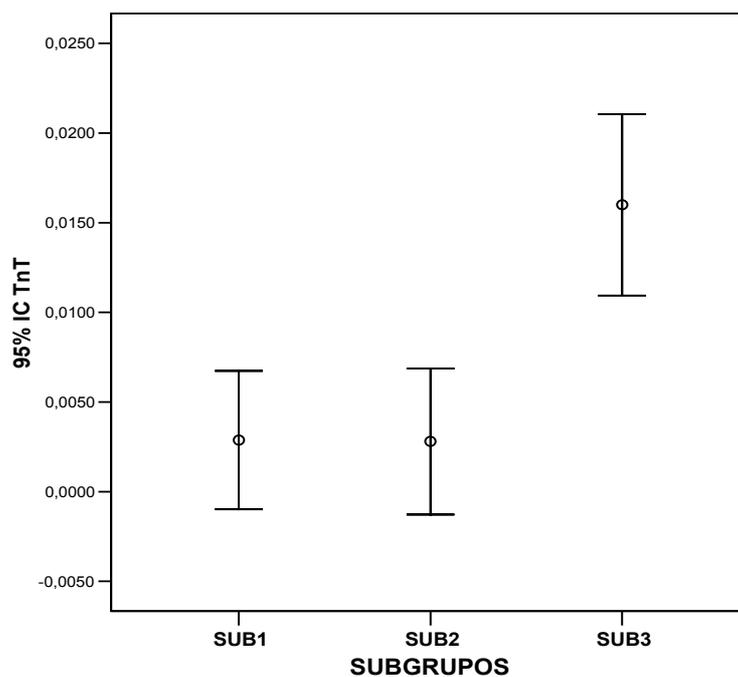


FIGURA 61. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE TnT ENTRE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 61 muestra que los valores de TnT detectados en suero de deportistas del subgrupo 3 son superiores a los que presentan los subgrupos 1 y 2. Siendo los valores de los subgrupos 1 y 2 muy parecidos.

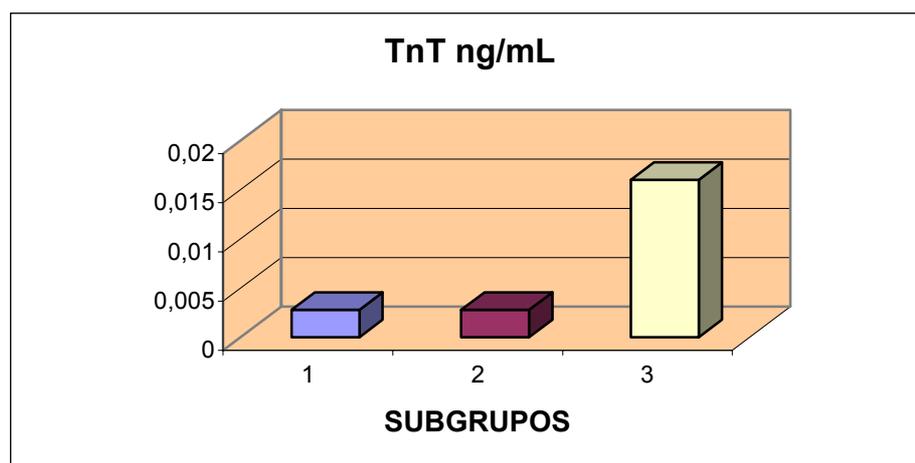


FIGURA 62. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE TnI EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.

En la figura 62 se observan los niveles medios de TnT en suero de los deportistas de los diferentes subgrupos de estudio. Como se puede deducir, los subgrupos 1 y 2 de deportistas de balonmano y rugby respectivamente presentan unos niveles medios más bajos en comparación con el subgrupo 3 que presenta unos niveles mayores de TnT.

## 2.6. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA-ACTINA.

En la figura 63 se observa como los niveles de  $\alpha$ -actina en suero del subgrupo 1 de sujetos deportistas de balonmano son más abundantes que el del resto de los grupos. Aunque podemos ver reflejado en la siguiente grafica como los valores de  $\alpha$ -actina del subgrupo 2 de sujetos deportistas de rugby presentan también valores más amplios que los del subgrupo 3.

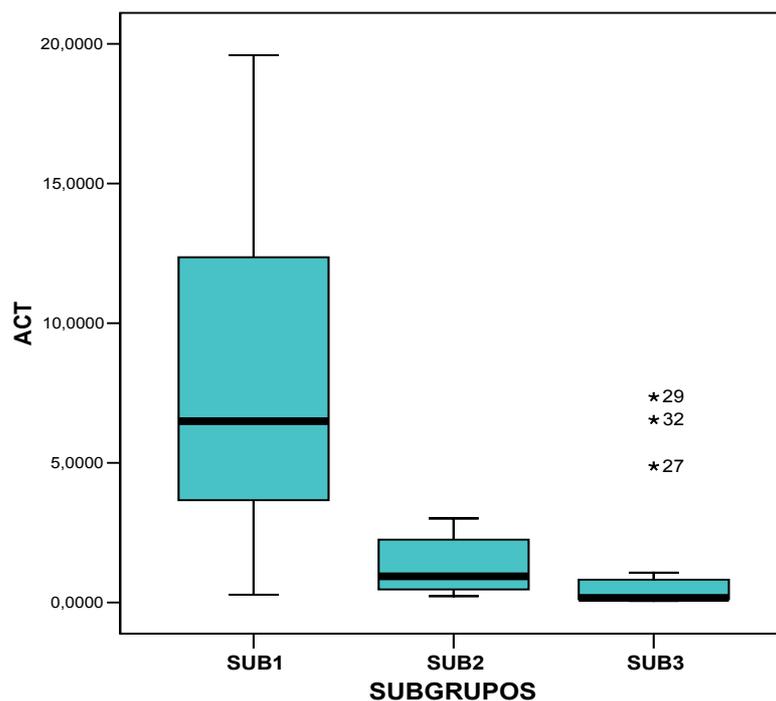


FIGURA 63. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE  $\alpha$ -ACTINA EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En la tabla 36 se observa la liberación de  $\alpha$ -actina detectada en suero de los diferentes subgrupos de estudio. En el subgrupo 1, formado por 16 deportistas, la liberación de  $\alpha$ -actina varía entre 0,28 y 19,6  $\mu$ gr/ml, con un

valor medio de 8,176  $\mu\text{gr/ml}$  y una desviación típica de 5,99  $\mu\text{gr/ml}$ . En el subgrupo 2, formado por 10 deportistas, la cantidad de  $\alpha$ -actina detectada en suero variaba entre 0,23 y 3,01  $\mu\text{gr/ml}$ , con un valor medio de 1,247  $\mu\text{gr/ml}$  y una desviación típica de 0,995.

DIAGNOSTICO $\alpha$ -ACTINA ( $\mu\text{gr/ml}$ )			
	SUBGRUPO 1	SUBGRUPO 2	SUBGRUPO 3
Número de sujetos	16	10	17
Media	8,1762	1,247	1,360
Error típico de la media	1,4991	0,314	0,581
Desv. Típ.	5,9964	0,995	2,397
Varianza	35,957	0,990	5,746

TABLA 36. CUADRO RESUMEN DE LOS NIVELES DE  $\alpha$ -ACTINA EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS.

En el subgrupo 3, formado por 17 deportistas, los niveles de  $\alpha$ -actina detectados en suero de los deportistas variaron entre 0,06 y 7,36  $\mu\text{gr/ml}$ , con un valor medio de 1,360  $\mu\text{gr/ml}$  y una desviación típica de 2,397 (Tabla 36).

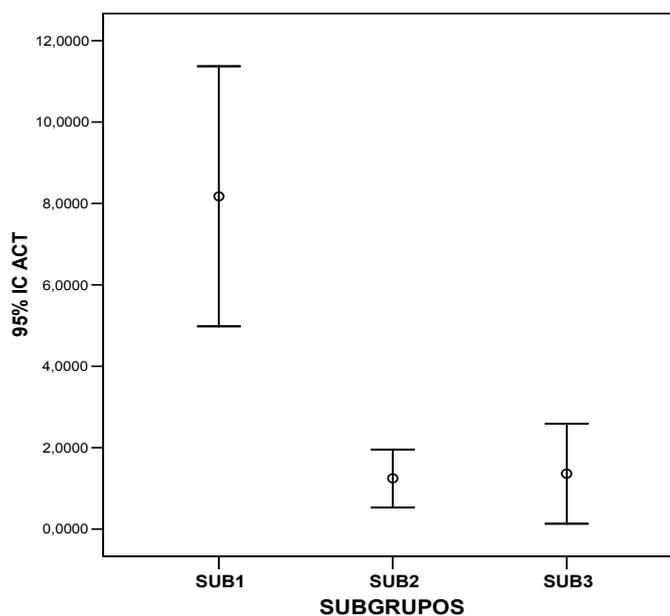


FIGURA 64. DIAGRAMA DE BARRAS DE ERROR COMPARANDO LA LIBERACIÓN DE  $\alpha$ -ACTINA ENTRE LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.

La Fig. 64 muestra que los valores de  $\alpha$ -actina en los subgrupos 2 y 3 son inferiores a los que presenta el subgrupo 1, siendo los valores del subgrupo 3 de deportistas de practica individual más altos que los del subgrupo 2.

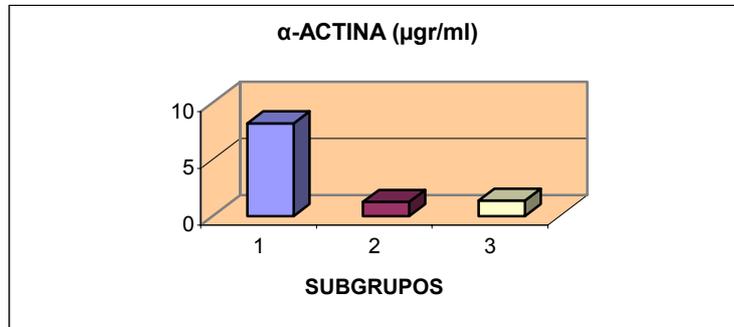


FIGURA 65. DIAGRAMA DE BARRAS DONDE SE REPRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE  $\alpha$ -ACTINA EN LOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE ESTUDIO.

En la figura 65 se observan los niveles medios de  $\alpha$ -actina en suero de los sujetos de los diferentes subgrupos de estudio. Como se puede deducir, el subgrupo 1 de deportistas de balonmano presentan unos niveles más elevados en comparación con el resto de los grupos, siendo sin embargo los niveles  $\alpha$ -actina de los subgrupos 1 y 2 muy parecidos.

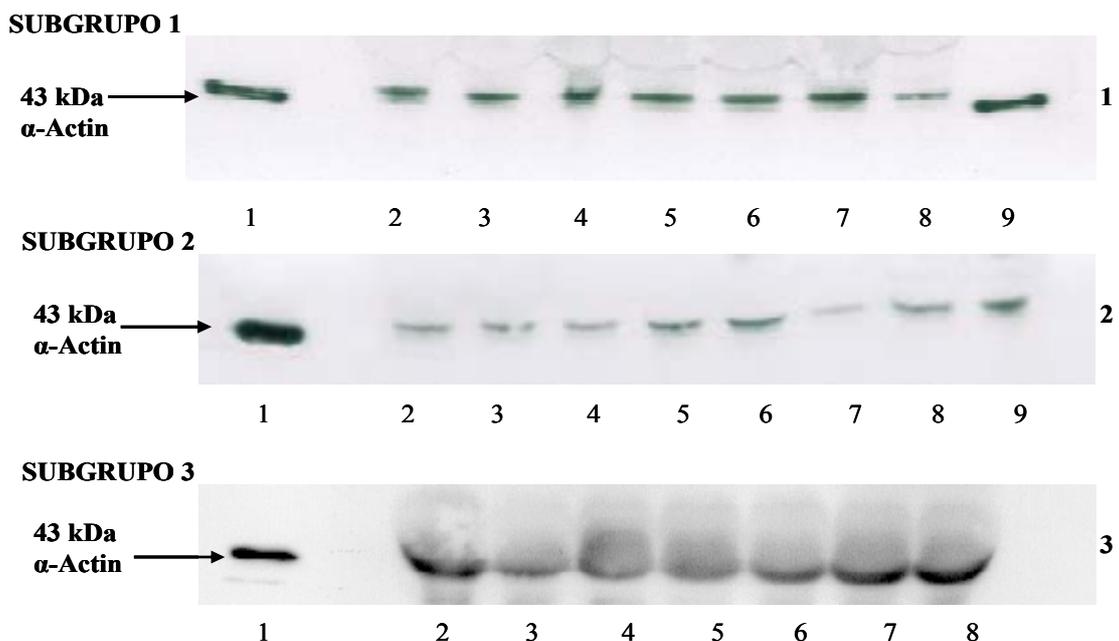


FIGURA 66. A. DETERMINACIÓN POR INMUNOBLOTING DE LOS NIVELES DE A-ACTINA EN LOS SUBGRUPOS 1, 2 Y 3.

En la figura 66 el primer gel representa los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de los sujetos del Subgrupo 1 (deportistas de balonmano), con una banda al nivel de 43 kDa. El número 1 se corresponde con el control positivo (80 ng/ $\mu$ l de actina pura) y del número 2 al 9 a los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de deportistas en reposo de balonmano. El segundo gel de la figura 60 representa los niveles de  $\alpha$ -actina en el Subgrupo 2 suero de deportistas del equipo de rugby en estado de reposo. El número 1 se corresponde con el control positivo (80 ng/ $\mu$ l de actina pura) y del número 2 al 9 a los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de dichos deportistas.

El tercer gel representa los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de los deportistas del Subgrupo 3 (deportes individuales), con una banda al nivel de 43 kDa. El número 1 se corresponde con el control positivo (80 ng/ $\mu$ l de actina pura) y del número 2 al 9 a los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de deportistas de practica individual en estado de reposo (Figura 66).

## 2.7. RESUMEN DE LOS NIVELES DE LAS VARIABLES DENTRO DE CADA GRUPO.

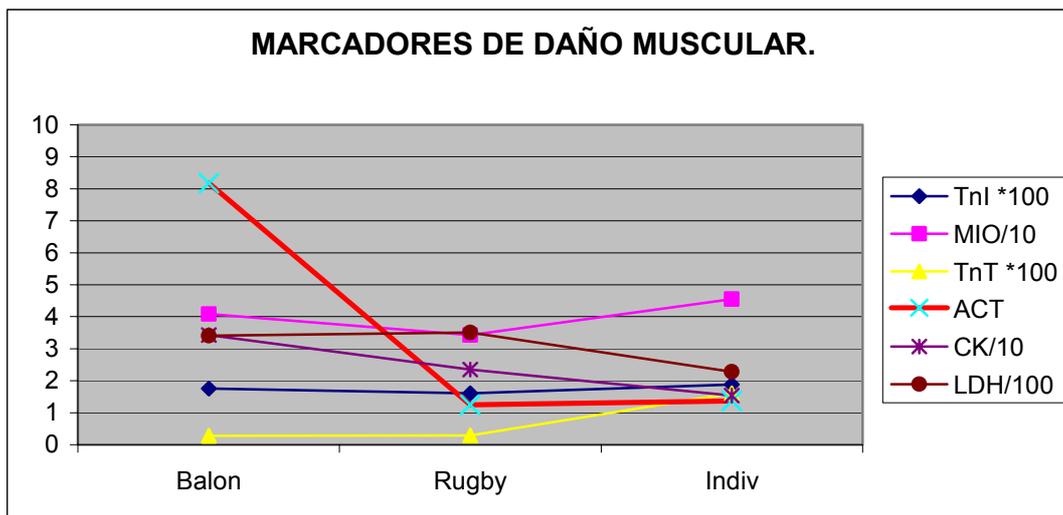


FIGURA 67. NIVELES DE LAS VARIABLES A TRAVÉS DE LAS TRES MODALIDADES DEPORTIVAS.

En la figura 67 podemos observar la descripción Inicial de los datos, donde está reflejada la media de cada marcador en cada grupo. Los

marcadores están reescalados de 0 a 100 para que puedan ser visualmente comparables.

## 2.8. ANALISIS INFERENCIAL DEL SEGUNDO ESTUDIO.

El análisis realizado fue un Manova unifactorial entregrupos en el que hay una VI con tres niveles y seis VD. El análisis con todos los datos es significativo para el vector de medias de VDs, es decir, los grupos han provocado diferencias significativas en el vector de medias de las VDs. (Traza de Pillai=0,928;  $F_{12, 72} = 7,528$ ;  $p = .0001$ ;  $\eta^2$  parcial= 0,556)

Como nos ha salido significativo el contraste anterior, pasamos a estudiar el efecto de los subgrupos sobre cada VD, siendo estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) todas las variables excepto la TnI y la mioglobina (Tabla 37).

Fuente	VD	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Rcuad corregi	Potencia observada(a)
GR	TnI	5,097E-05	2	2,549E-05	,350	,707	,017	-0.032	,102
	MIO	808,095	2	404,048	1,944	,156	,089	0.043	,379
	TnT	,002	2	,001	13,539	,000	,404	0.374	,997
	ACT	472,553	2	236,277	14,762	,000	,425	0.396	,998
	CK	294351,518	2	147175,759	14,253	,000	,416	0.387	,998
	LDH	139728,995	2	69864,498	22,619	,000	,531	0.507	1,000
Error	TnI	,003	40	7,291E-05					
	MIO	8313,082	40	207,827					
	TnT	,003	40	6,568E-05					
	ACT	640,215	40	16,005					
	CK	413035,459	40	10325,886					
	LDH	123549,702	40	3088,743					

TABLA 37. PRUEBAS DE LOS EFECTOS DE LA VI SOBRE CADA VD

A continuación analizaremos los pares de grupos dos a dos mediante la prueba estadístico de contraste para cada variable dependiente, para ver la significatividad de cada variable (contrastos Post-Hoc o a posteriori)

<b>TnT</b>	<b>Balonmano(1)</b>	<b>Rugby (2)</b>	<b>Individ (3)</b>
<b>Balonmano (1)</b>		<b>0,982</b>	<b>0,0001**</b>
<b>Rugby (2)</b>			<b>0,0001**</b>
<b>Individ (3)</b>			

TABLA 38. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE TNT.

En la tabla 38 observamos la significatividad de la variable dependiente TnT con los 3 grupos de estudio (Subgrupos 1, 2 y 3). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la TnT entre los subgrupos individuales (3) y subgrupo balonmano (1). También se ven diferencias significativas en la TnT entre el subgrupo de estudio individual (3) y rugby (2). ORDEN: Indiv > Balonm =Rugby

<b>ACT</b>	<b>Balonmano(1)</b>	<b>Rugby (2)</b>	<b>Individ (3)</b>
<b>Balonmano (1)</b>		<b>0,001**</b>	<b>0,001**</b>
<b>Rugby (2)</b>			<b>0,998</b>
<b>Individ (3)</b>			

TABLA 39. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE ACT.

En la tabla 39 observamos la significatividad de la variable dependiente ACT con los 3 grupos de estudio (Subgrupos 1, 2 y 3). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la ACT entre los subgrupos rugby (2) y subgrupo balonmano (1). También se ven diferencias significativas en la ACT entre el subgrupo de estudio individual (3) y balonmano (1). ORDEN: Balonm>Rugby=Indiv.

<b>CK</b>	<b>Balonmano(1)</b>	<b>Rugby (2)</b>	<b>Individ (3)</b>
<b>Balonmano (1)</b>		<b>0,013*</b>	<b>0,0001**</b>
<b>Rugby (2)</b>			<b>0,051</b>
<b>Individ (3)</b>			

TABLA 40. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE CK.

En la tabla 40 observamos la significatividad de la variable dependiente CK con los 3 grupos de estudio (Subgrupos 1, 2 y 3). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la CK entre los subgrupos rugby (2) y subgrupo balonmano (1). También se ven diferencias significativas en la CK entre el

subgrupo de estudio individual (3) y balonmano (1). ORDEN:  
Balonmano>Rugby=Indiv

LDH	Balonmano(1)	Rugby (2)	Individ (3)
Balonmano (1)		0,849	0,0001**
Rugby (2)			0.0001**
Individ (3)			

TABLA 41. ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE DE LA VARIABLE DEPENDIENTE LDH.

En la tabla 41 observamos la significatividad de la variable dependiente LDH con los 3 grupos de estudio (Subgrupos 1, 2 y 3). Siendo estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) la LDH entre los subgrupos individuales (3) y subgrupo balonmano (1). También se ven diferencias significativas en la LDH entre el subgrupo de estudio individual (3) y rugby (2). ORDEN: Balonmano Rugby>Indiv.

### 3. ESTUDIO 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS SUBGRUPOS 1 Y 2 (BALONMANO Y RUGBY) ANTES Y DESPUÉS DE UN PARTIDO DE ALTA COMPETICIÓN.

Los resultados reflejados a continuación representan los valores de los diferentes marcadores en condiciones basales y tras un esfuerzo físico, siendo en este caso un partido de alta competición, esto es, la determinación en suero de las variables con los sujetos de los distintos grupos en reposo y tras la practica de un partido de alta competición, siendo para el subgrupo 1 un partido de balonmano y para el subgrupo 2 un partido de rugby.

#### 3.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE MIOGLOBINA .

En la tabla 42 se observa la liberación de mioglobina detectada en suero antes y después de un partido de alta competición de los diferentes subgrupos de estudio (balonmano y rugby). En el subgrupo 1 (balonmano), formado por 13 deportistas, la concentración media de mioglobina antes del partido es de

34,91 ng/mL y después del partido de 158,35 ng/mL, con una desviación típica de 12,9 antes de partido y de 69,06 después del partido.

MIOGLOBINA	MEDIAS		DESVIACION TIPICA	
	Pre	Post	Pre	Post
Balonmano (SUB.1)	34,9154	158,35	12,9979	69,0642
Rugby (SUB.2)	34,23	323,69	6,8243	130,9369

TABLA 42. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE MIOGLOBINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

En el subgrupo 2 (rugby), formado por 10 deportistas, la cantidad media de mioglobina detectada en suero antes del partido fue de 34,23 ng/mL y de 323,69 después del partido, con una desviación típica de 6,82 antes del partido y de 130,9 después del partido (Tabla 42).

En la figura 68 podemos observar como ascienden los niveles de mioglobina después del partido de competición, en las dos disciplinas diferentes (balonmano y rugby), subiendo más los niveles de mioglobina en el suero de los jugadores de balonmano, con respecto a la toma que se realizó antes del partido.

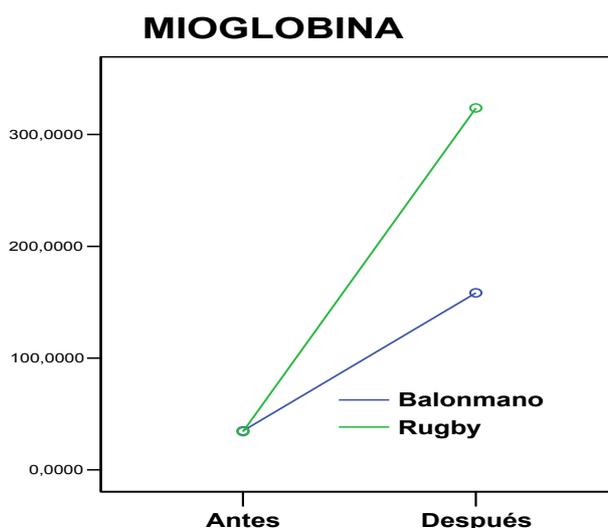


FIGURA 68. GRAFICA DE VALORES DE MIOGLOBINA DETECTADOS EN LOS DEPORTISTAS ANTES Y DESPUES DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DIFERENTES DISCIPLINAS.

En la figura 69 podemos ver representados los valores medios de la mioglobina en cada momento de estudio y en las dos disciplinas deportivas analizadas.

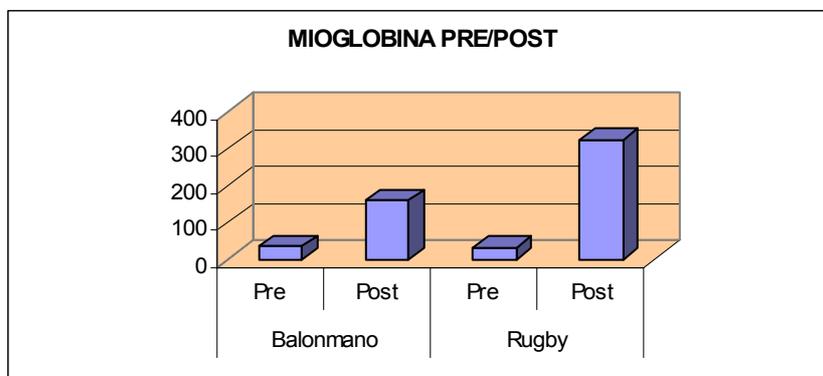


FIGURA 69. NIVELES MEDIOS DE MIOGLOBINA ANTES Y DESPUÉS DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DOS MODALIDADES DEPORTIVAS ANALIZADAS.

### 3.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE CREATINA FOSFOQUINASA.

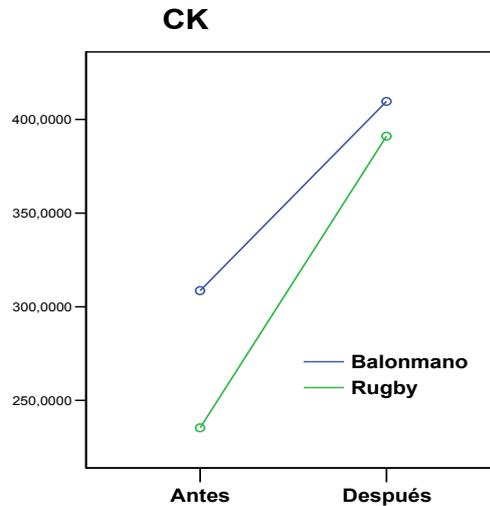
En la tabla 43 se observa la liberación de CPK detectada en suero antes y después de un partido de alta competición de los diferentes subgrupos de estudio (balonmano y rugby). En el subgrupo 1 (balonmano), formado por 13 deportistas, la concentración media de CPK antes del partido fue de 308,61 UI/L y después del partido de 409,6 UI/L, con una desviación típica de 149,3 antes de partido y de 191,3 después del partido.

CPK	MEDIAS		DESVIACION TIPICA	
	Pre	Post	Pre	Post
<b>Balonmano (SUB.1)</b>	308,61	409,692	149,3137	191,3397
<b>Rugby (SUB.2)</b>	235,4	391,1	73,3321	111,226

TABLA 43. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE CPK EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

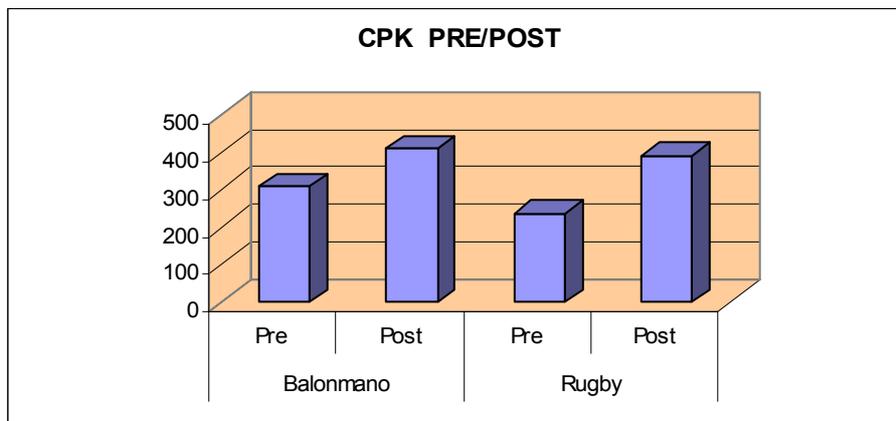
En el subgrupo 2 (rugby), formado por 10 deportistas, la cantidad media de CPK detectada en suero antes del partido fue de 235,4 UI/L y de 391,1 UI/L

después del partido, con una desviación típica de 73,3 antes del partido y de 111,2 después del partido (Tabla 43).



**FIGURA 70. GRAFICA DE VALORES DE CPK DETECTADOS EN LOS DEPORTISTAS ANTES Y DESPUES DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DIFERENTES DISCIPLINAS.**

En la figura 70 podemos observar como ascienden los niveles de CPK después del partido de competición, en las dos disciplinas diferentes (balonmano y rugby), subiendo más los niveles de CPK en el suero de los jugadores de balonmano, con respecto a la toma que se realizó antes del partido. También podemos observar en la grafica como el grupo de jugadores de balonmano parten de unos niveles basales de CPK más altos que los del otro grupo.



**FIGURA 71. NIVELES MEDIOS DE CPK ANTES Y DESPUÉS DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DOS MODALIDADES DEPORTIVAS ANALIZADAS.**

En la figura 71 podemos ver representados los valores medios de CPK en cada momento de estudio y en las dos disciplinas deportivas analizadas.

### 3.3. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LDH.

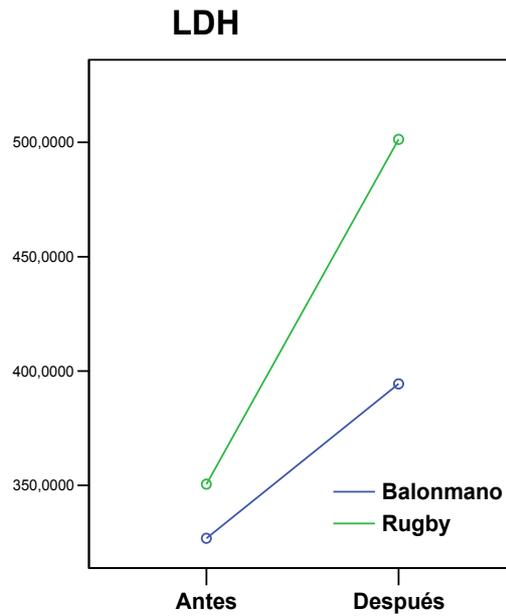
En la tabla 44 se observa la liberación de LDH detectada en suero antes y después de un partido de alta competición de los diferentes subgrupos de estudio (balonmano y rugby). En el subgrupo 1 (balonmano), formado por 13 deportistas, la concentración media de LDH antes del partido fue de 326,8 UI/L y después del partido de 394,3 UI/L, con una desviación típica de 31,6 antes de partido y de 38,1 después del partido.

En el subgrupo 2 (rugby), formado por 10 deportistas, la cantidad media de LDH detectada en suero antes del partido fue de 300,5 UI/L y de 501,3 UI/L después del partido, con una desviación típica de 32,8 antes del partido y de 72,5 después del partido (Tabla 44).

LDH	MEDIAS		DESVIACION TIPICA	
	Pre	Post	Pre	Post
Balonmano (SUB.1)	326,8461	394,3846	31,6961	38,1806
Rugby (SUB.2)	300,5	501,3	32,8134	72,5044

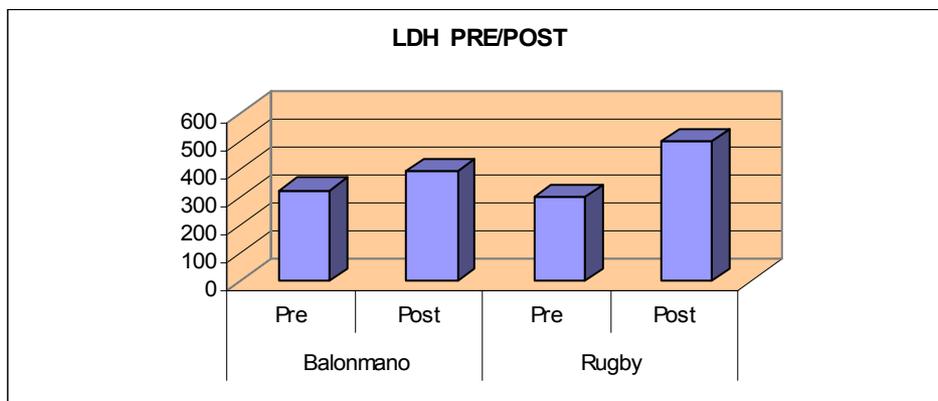
TABLA 44. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE LDH EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

En la figura 72 podemos observar como ascienden los niveles de LDH después del partido de competición, en las dos disciplinas diferentes (balonmano y rugby), subiendo más los niveles de LDH en el suero de los jugadores de rugby, con respecto a la toma que se realizó antes del partido. También podemos observar en la grafica como el grupo de jugadores de balonmano parten de unos niveles basales de LDH un poco más altos que los del otro grupo.



**FIGURA 72. GRAFICA DE VALORES DE LDH DETECTADOS EN LOS DEPORTISTAS ANTES Y DESPUES DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DIFERENTES DISCIPLINAS.**

En la figura 73 podemos ver representados los valores medios de LDH en cada momento de estudio y en las dos disciplinas deportivas analizadas.



**FIGURA 73. NIVELES MEDIOS DE LDH ANTES Y DESPUÉS DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DOS MODALIDADES DEPORTIVAS ANALIZADAS.**

### 3.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE Tnl.

En la tabla 45 se observa la liberación de Tnl detectada en suero antes y después de un partido de alta competición de los diferentes subgrupos de estudio (balonmano y rugby). En el subgrupo 1 (balonmano), formado por 13 deportistas, la concentración media de Tnl antes del partido fue de 0,019

ng/mL y después del partido de 0,019 ng/mL, con una desviación típica de 0,009 antes de partido y de 0,01 después del partido.

Tnl	MEDIAS		DESVIACION TIPICA	
	Pre	Post	Pre	Post
Balonmano (SUB.1)	0,019	0,019	0,0095	0,0166
Rugby (SUB.2)	0,016	0,016	0,0084	0,0107

TABLA 45. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE Tnl EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.

En el subgrupo 2 (rugby), formado por 10 deportistas, la cantidad media de Tnl detectada en suero antes del partido fue de 0,016 ng/mL y de 0,016 ng/mL después del partido, con una desviación típica de 0,008 antes del partido y de 0,010 después del partido (Tabla 45).

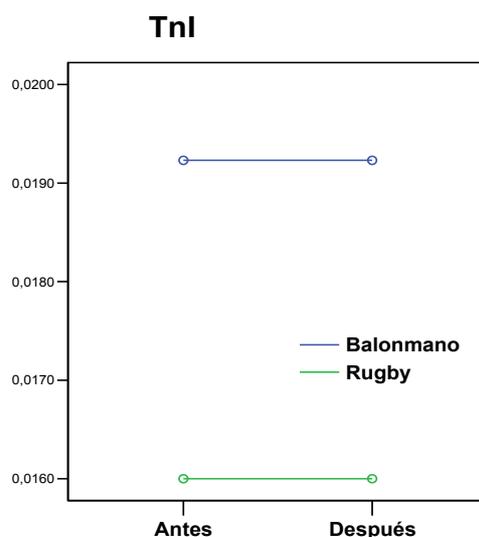
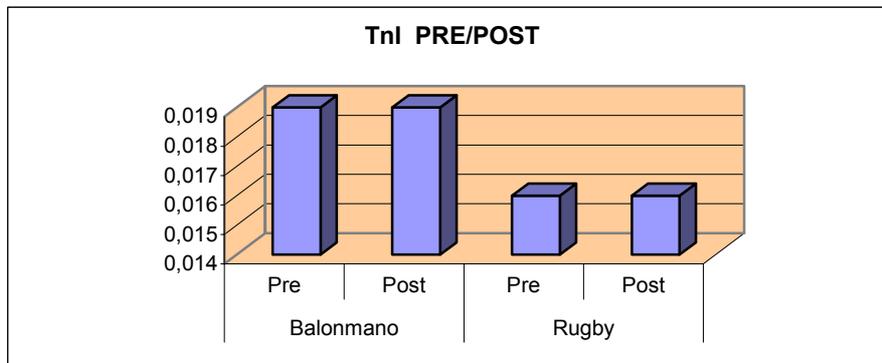


FIGURA 74. GRAFICA DE VALORES DE Tnl DETECTADOS EN LOS DEPORTISTAS ANTES Y DESPUES DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DIFERENTES DISCIPLINAS.

En la figura 74 podemos observar como se mantienen los mismos niveles de Tnl antes y después del partido de competición, en las dos disciplinas diferentes (balonmano y rugby), siendo más altos los niveles de LDH en el suero de los jugadores de balonmano, con respecto al grupo de jugadores de balonmano. También podemos observar en la grafica como el grupo de jugadores de balonmano parten de unos niveles basales de LDH un poco más

altos que los del otro grupo, manteniéndose estos niveles tras la práctica del partido.



**FIGURA 75. NIVELES MEDIOS DE TnI ANTES Y DESPUÉS DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DOS MODALIDADES DEPORTIVAS ANALIZADAS.**

En la figura 75 podemos ver representados los valores medios de TnI en cada momento de estudio y en las dos disciplinas deportivas analizadas.

### 3.5. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnT.

En la tabla 46 se observa la liberación de TnT detectada en suero antes y después de un partido de alta competición de los diferentes subgrupos de estudio (balonmano y rugby). En el subgrupo 1 (balonmano), formado por 13 deportistas, la concentración media de TnT antes del partido fue de 0,0032 ng/mL y después del partido de 0,036 ng/mL, con una desviación típica de 0,008 antes de partido y de 0,01 después del partido.

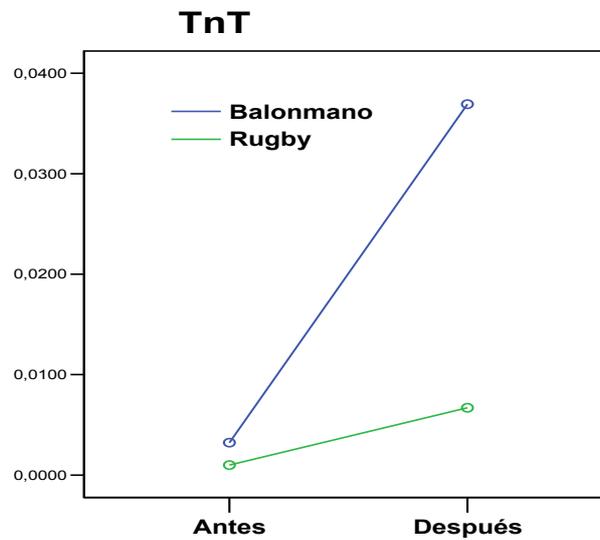
TnT	MEDIAS		DESVIACION TIPICA	
	Pre	Post	Pre	Post
<b>Balonmano (SUB.1)</b>	0,0032	0,0369	0,008	0,0103
<b>Rugby (SUB.2)</b>	0,0032	0,0067	0,008	0,0038

**TABLA 46. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE TnT EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.**

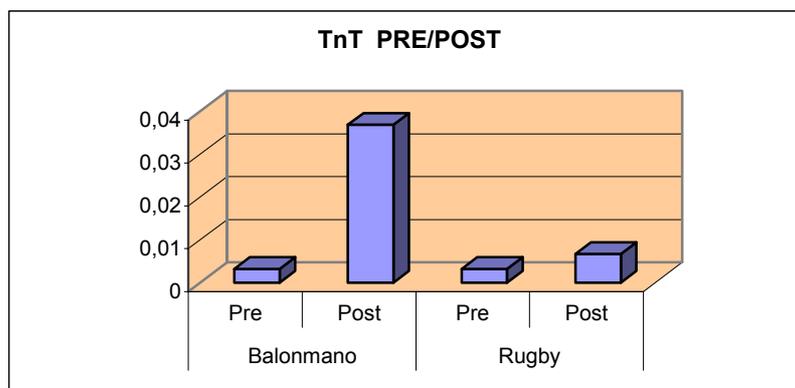
En el subgrupo 2 (rugby), formado por 10 deportistas, la cantidad media de TnT detectada en suero antes del partido fue de 0,003 ng/mL y de 0,006

ng/mL después del partido, con una desviación típica de 0,008 antes del partido y de 0,010 después del partido (Tabla 46).

En la figura 76 podemos observar como ascienden los niveles de TnT después del partido de competición, en las dos disciplinas diferentes (balonmano y rugby), siendo más altos los niveles de TnT en el suero de los jugadores de balonmano tras el partido, con respecto al grupo de jugadores de rugby. También podemos observar en la grafica como los dos grupos de jugadores parten de unos niveles basales de TnT muy similares.



**FIGURA 76. GRAFICA DE VALORES DE TnT DETECTADOS EN LOS DEPORTISTAS ANTES Y DESPUES DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DIFERENTES DISCIPLINAS.**



**FIGURA 77. NIVELES MEDIOS DE TnT ANTES Y DESPUÉS DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DOS MODALIDADES DEPORTIVAS ANALIZADAS.**

En la figura 77 podemos ver representados los valores medios de TnT en cada momento de estudio y en las dos disciplinas deportivas analizadas.

### 3.6. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA-ACTINA.

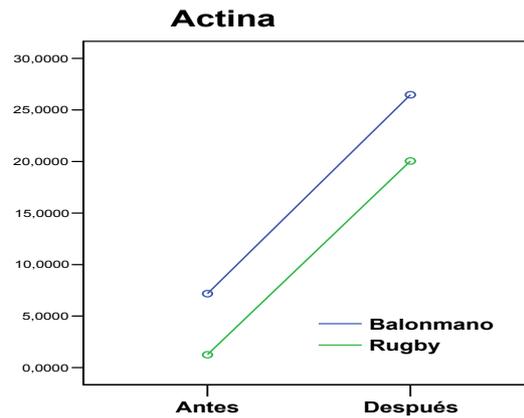
En la tabla 47 se observa la liberación de  $\alpha$ -actina detectada en suero antes y después de un partido de alta competición de los diferentes subgrupos de estudio (balonmano y rugby). En el subgrupo 1 (balonmano), formado por 13 deportistas, la concentración media de  $\alpha$ -actina antes del partido fue de 7,169  $\mu\text{gr/ml}$  y después del partido de 26,47  $\mu\text{gr/ml}$  con una desviación típica de 5,64 antes de partido y de 9,72 después del partido.

ALFA ACTINA	MEDIAS		DESVIACION TIPICA	
	Pre	Post	Pre	Post
Balonmano (SUB.1)	7,1692	26,47	5,6406	9,7299
Rugby (SUB.2)	1,247	20,04	0,9952	5,5243

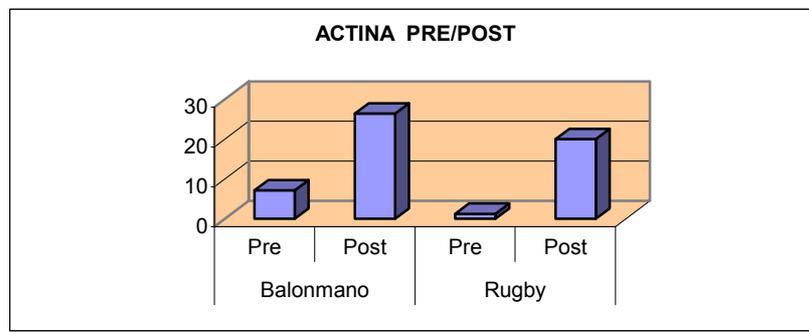
**TABLA 47. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE ACTINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.**

En el subgrupo 2 (rugby), formado por 10 deportistas, la cantidad media de  $\alpha$ -actina detectada en suero antes del partido fue de 1,24  $\mu\text{gr/ml}$  y de 20,04  $\mu\text{gr/ml}$  después del partido, con una desviación típica de 0,99 antes del partido y de 5,52 después del partido (Tabla 47).

En la figura 78 podemos observar como ascienden los niveles de  $\alpha$ -actina después del partido de competición, en las dos disciplinas diferentes (balonmano y rugby), siendo más altos los niveles de  $\alpha$ -actina en el suero de los jugadores de balonmano tras el partido, con respecto al grupo de jugadores de rugby. También podemos observar en la grafica como los dos grupos de jugadores parten de unos niveles basales de  $\alpha$ -actina muy similares siendo más alto los niveles del grupo de jugadores de balonmano.

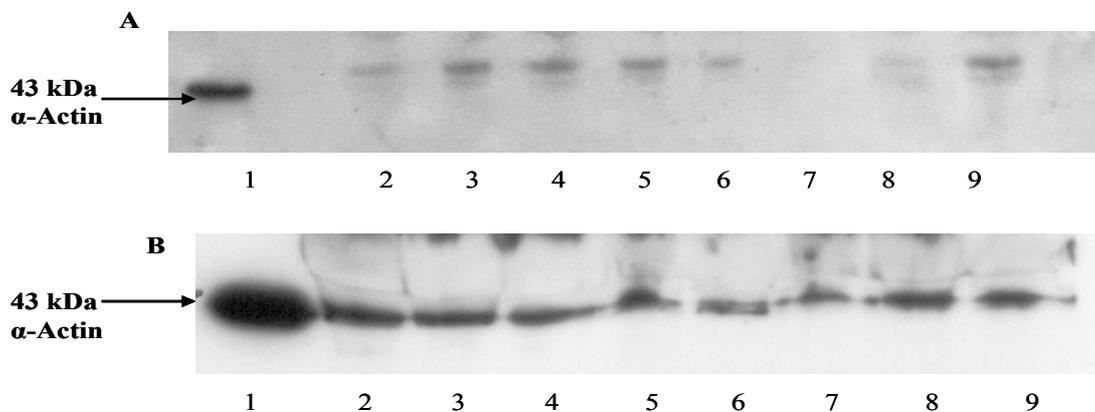


**FIGURA 78. GRAFICA DE VALORES DE ACTINA DETECTADOS EN LOS DEPORTISTAS ANTES Y DESPUES DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DIFERENTES DISCIPLINAS.**



**FIGURA 79. NIVELES MEDIOS DE ACTINA ANTES Y DESPUÉS DEL PARTIDO DE COMPETICIÓN EN LAS DOS MODALIDADES DEPORTIVAS ANALIZADAS.**

En la figura 79 podemos ver representados los valores medios de actina en cada momento de estudio y en las dos disciplinas deportivas analizadas.



**FIGURA 80. A. DETERMINACIÓN POR INMUNOBLOTTING DE LOS NIVELES DE A-ACTINA EN EL SUBGRUPO 1 ANTES (A) Y DEPUÉS (B) DE UN PARTIDO DE ALTA COMPETI.**

En la figura 80 el primer gel representa los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de los sujetos del Subgrupo 1 antes del partido (deportistas de balonmano), con una banda al nivel de 43 kDa. El número 1 se corresponde con el control positivo (80 ng/ $\mu$ l de actina pura) y del número 2 al 9 a los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de deportistas en reposo de balonmano. El segundo gel de la figura 74 representa los niveles de  $\alpha$ -actina suero de los mismos deportistas depuse del partido de alta competición. El número 1 se corresponde con el control positivo (80 ng/ $\mu$ l de actina pura) y del número 2 al 9 a los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de dichos deportistas.

### 3.7. ANALISIS INFERENCIAL DEL TERCER ESTUDIO.

En la tabla 48 observamos el efecto de cada VI por separado (mom y grupo) y su interacción (mom \* grupo) sobre los vectores de VD (todas las VD consideradas globalmente). En la tabla 48 vemos claramente que todo es significativo ( $p < 0.001$ ). Elegiríamos la Traza de Pillai por ser el estadístico más estricto ya que alguna variable incumple algún supuesto.

Efecto			Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Significación	Eta al cuadrado parcial	Potencia observada(a)
<b>Entre sujetos</b>	<b>grupo</b>	Traza de Pillai	,903	24,864(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,903	1,000
		Lambda de Wilks	,097	24,864(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,903	1,000
		Traza de Hotelling	9,324	24,864(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,903	1,000
		Raíz mayor de Roy	9,324	24,864(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,903	1,000
<b>Intra-sujetos</b>	<b>mom</b>	Traza de Pillai	,962	68,085(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,962	1,000
		Lambda de Wilks	,038	68,085(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,962	1,000
		Traza de Hotelling	25,532	68,085(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,962	1,000
		Raíz mayor de Roy	25,532	68,085(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,962	1,000
	<b>mom * grupo</b>	Traza de Pillai	,852	15,390(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,852	1,000
		Lambda de Wilks	,148	15,390(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,852	1,000
		Traza de Hotelling	5,771	15,390(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,852	1,000
		Raíz mayor de Roy	5,771	15,390(b)	6,000	16,000	<b>,000</b>	,852	1,000

a Calculado con alfa = ,05

b Estadístico exacto

c Diseño: Intercept+grupo Diseño intra sujetos: mom

**TABLA 48. CONTRASTES MULTIVARIADOS**

Una vez realizado el contraste conjunto, se estudian las variables de medidas repetidas momento, e interacción, mom\*grupo. La variable momento o

prepost es significativa en todas las VDs excepto en Tnl. La interacción mom\*grupo (es decir hay diferencias al aplicar conjuntamente ambas variables) es significativa en las VDs: MIO, TNT Y LDH (Tabla 15 Apéndice).

Fuente	Medida	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad	Potencia observada(a)
grupo	tmi	,000	1	,000	,865	,363	,040	,865	,144
	mio	76614,866	1	76614,866	13,913	,001	,399	13,913	,945
	tnt	,003	1	,003	104,025	,000	,832	104,025	1,000
	act	431,063	1	431,063	9,308	,006	,307	9,308	,829
	ck	23820,105	1	23820,105	,601	,447	,028	,601	,115
	ldh	48180,046	1	48180,046	14,695	,001	,412	14,695	,955
Error	tmi	,003	21	,000					
	mio	115641,072	21	5506,718					
	tnt	,001	21	2,861E-05					
	act	972,485	21	46,309					
	ck	832190,635	21	39628,125					
	ldh	68853,954	21	3278,760					

a Calculado con alfa = ,05

**TABLA 49. PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS**

En la tabla 49. Se observa que sólo tienen efecto el factor o VI grupo sobre las VDs: MIO, TNT, ACT, y LDH, esto quiere decir que todas estas variables son estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ), no lo siendo la Tnl y la CK.

#### **4. ESTUDIO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL GRUPO DE JUGADORES DE BALONMANO (SUBGRUPO 1), TRAS LA REALIZACIÓN DE UN TEST DE ESFUERZO MÁXIMO.**

Los resultados reflejados a continuación representan los valores de los diferentes marcadores en condiciones basales y tras un esfuerzo físico, siendo en este caso la realización de un test de esfuerzo en tapiz rodante, esto es, la determinación en suero de las variables con los sujetos del grupo de jugadores de balonmano (subgrupo 1) en reposo, tras la realización de un test de esfuerzo en tapiz rodante, a la hora de la realización del test y justo a las 24 horas de haber realizado dicho test de esfuerzo.

#### 4.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE MIOGLOBINA .

En la tabla 50 se observa la liberación de mioglobina detectada en suero antes, después, una hora y 24 horas después del un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante del grupo de estudio (jugadores de balonmano). En el la primera toma realizada antes del test de esfuerzo, la concentración media de mioglobina fue de 41,8333 ng/mL, la realizada después del test de 56,3 ng/mL, en la tercera toma, realizada a la hora de haber terminado el test se detecto una concentración media de mioglobina de 83,25 ng/mL y en la ultima toma realizada a las 24 horas se detectó unos niveles de 78,688 ng/mL de mioglobina en suero de los deportistas analizados.

MIOGLOBINA ( ng/mL)	TEST DE ESFUERZO EN TAPIZ RODANTE			
	ANTES	DESPUES	1 HORA	24 HORAS
MEDIAS	41,8333	56,3	83,2556	78,6889
DESVIACION TIPICA	14,386	19,936	35,216	23,668

TABLA 50. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE ACTINA EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DE ESTUDIO.

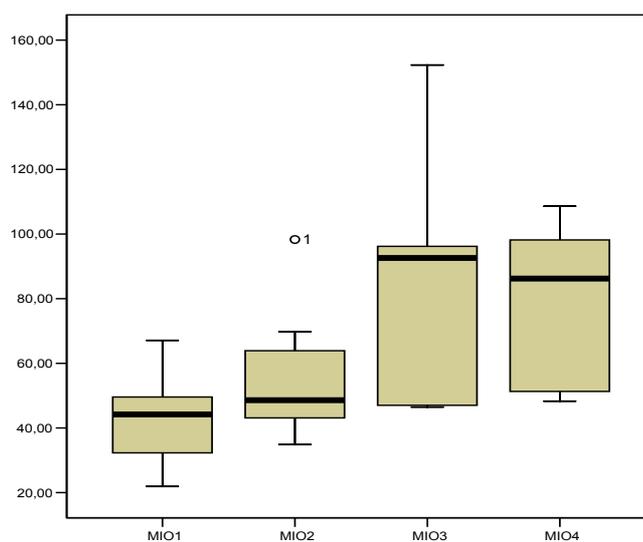


FIGURA 81. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE MIOGLOBINA EN LOS DIFERENTES MOMENTOS.

En la figura 81 se observa como los niveles de mioglobina en suero van ascendiendo de una toma a otra, siendo la primera toma donde encontramos los niveles más bajos de mioglobina. Aunque podemos ver reflejado como los valores de mioglobina se igualan prácticamente en las dos últimas tomas.

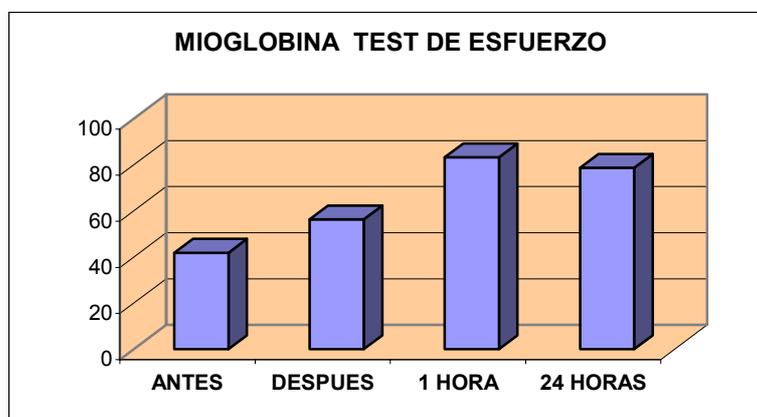


FIGURA 82. NIVELES MEDIOS DE MIOGLOBINA ANTES, DESPUÉS, 1 HORA Y 24 HORAS DEPUÉS DEL TEST DE ESFUERZO.

En la figura 82 podemos ver representados los valores medios de mioglobina y su evolución a lo largo del estudio realizado.

#### 4.2. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE CREATINA FOSFOQUINASA.

En la tabla 51 se observa la liberación de CPK actividad detectada en suero antes, después, una hora y 24 horas después del un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante del grupo de estudio (jugadores de balonmano). En la primera toma realizada antes del test de esfuerzo, la concentración media de CPK actividad fue de 378,55 UI/L, la realizada después del test de 437,3 UI/L, en la tercera toma, realizada a la hora de haber terminado el test se detectó una concentración media de CPK de 424 UI/L y en la última toma realizada a las 24 horas se detectó unos niveles de 360,4 UI/L de CPK en suero de los deportistas analizados.

CK UI/L	TEST DE ESFUERZO EN TAPIZ RODANTE			
	ANTES	DESPUES	1 HORA	24 HORAS
MEDIAS	378,5556	437,3333	424	360,4444
DESVIACION TIPICA	149,55	170,52	160,96	115,42

TABLA 51. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE CPK EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DE ESTUDIO

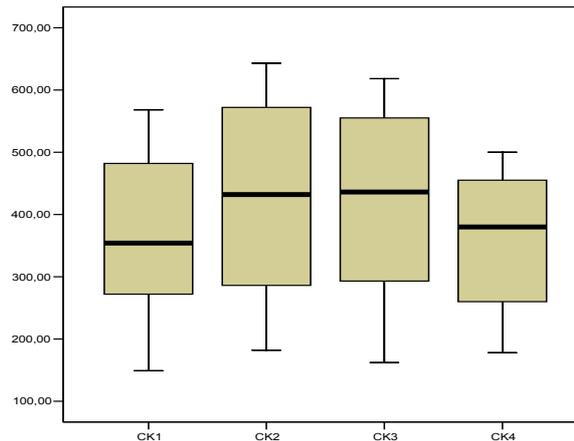


FIGURA 83. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE CK EN LOS DIFERENTES MOMENTOS.

En la figura 83 se observa como los niveles de CK en suero se elevan en la segunda toma con respecto a la primera, empezando a descender los niveles de CK en suero ya a partir de la tercera toma, a la hora de haber finalizado el test de esfuerzo. Quedándose en la última toma (24 horas después) los niveles de CK más bajos que en el primer análisis.

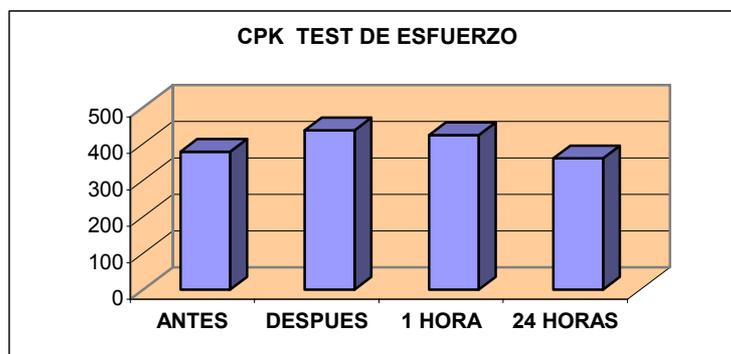


FIGURA 84. NIVELES MEDIOS DE CPK ANTES, DESPUÉS, 1 HORA Y 24 HORAS DEPUÉS DEL TEST DE ESFUERZO.

En la figura 84 podemos ver representados los valores medios de CPK y su evolución a lo largo del estudio realizado.

#### 4.3. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE LDH.

En la tabla 52 se observa la liberación de LDH actividad detectada en suero antes, después, una hora y 24 horas después del un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante del grupo de estudio (jugadores de balonmano). En la primera toma realizada antes del test de esfuerzo, la concentración media de LDH fue de 371,1 UI/L, la realizada después del test de 400,8 UI/L, en la tercera toma, realizada a la hora de haber terminado el test se detectó una concentración media de LDH de 392,4 UI/L y en la última toma realizada a las 24 horas se detectó unos niveles de 393,1 UI/L de LDH en suero de los deportistas analizados.

LDH UI/L	TEST DE ESFUERZO EN TAPIZ RODANTE			
	ANTES	DESPUES	1 HORA	24 HORAS
MEDIAS	371,1111	400,8889	392,4444	393,1111
DESVIACION TIPICA	41,88	31,31	82,48	38,55

TABLA 52. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE LDH EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DE ESTUDIO.

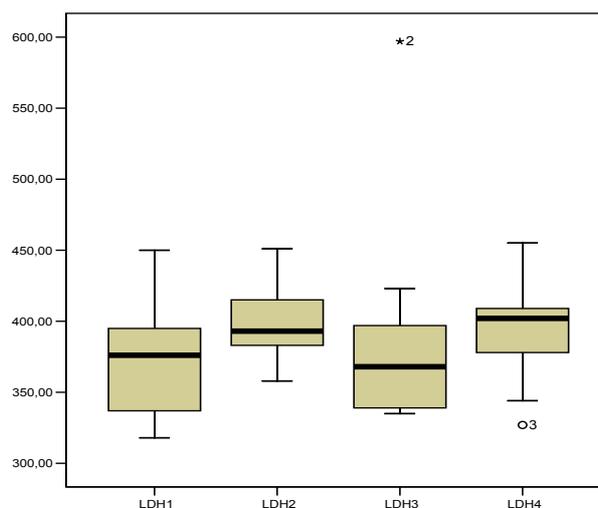


FIGURA 85. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE LDH EN LOS DIFERENTES MOMENTOS.

En la figura 85 se observa como los niveles de LDH en suero se elevan en la segunda toma con respecto a la primera, empezando a descender los niveles de LDH en suero ya a partir de la tercera toma, a la hora de haber finalizado el test de esfuerzo. Finalmente vemos como los niveles de LDH asciende en la ultima toma realizada a las 24 horas con respecto a la primera toma pero teniendo un nivel muy parecido a a la tercera toma que se realizó a la hora de haber finalizado el test de esfuerzo.

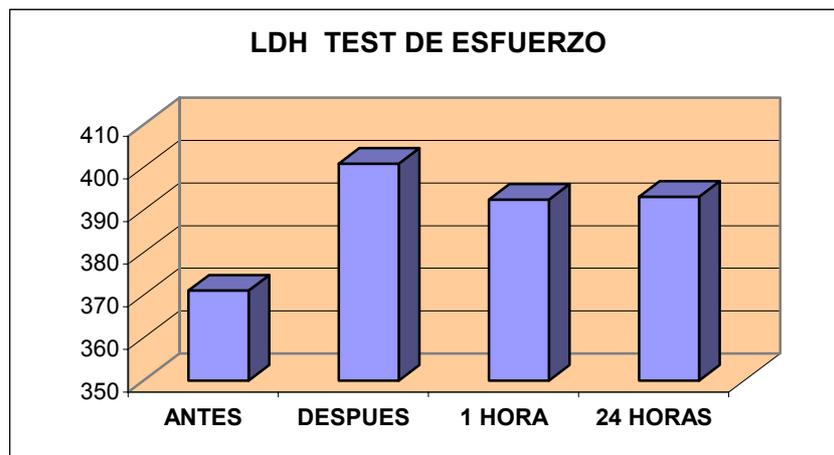


FIGURA 86. NIVELES MEDIOS DE LDH ANTES, DESPUÉS, 1 HORA Y 24 HORAS DEPUÉS DEL TEST DE ESFUERZO.

En la figura 86 podemos ver representados los valores medios de LDH y su evolución a lo largo del estudio realizado.

#### 4.4. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnI.

En la tabla 53 se observa la liberación de TnI detectada en suero antes, después, una hora y 24 horas después del un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante del grupo de estudio (jugadores de balonmano). En la primera toma realizada antes del test de esfuerzo, la concentración media de TnI fue de 0,016 ng/mL, la realizada después del test de 0,016 ng/mL, en la tercera toma, realizada a la hora de haber terminado el test se detecto una concentración media de TnI de 0,015 ng/mL y en la ultima toma realizada a las 24 horas se detectó unos niveles de 0,013 ng/mL de TnI en suero de los deportistas analizados.

TnI ng/mL	TEST DE ESFUERZO EN TAPIZ RODANTE			
	ANTES	DESPUES	1 HORA	24 HORAS
MEDIAS	0,01666	0,01666	0,01560	0,01330
DESVIACION TIPICA	0,0070	0,005	0,0052	0,005

TABLA 53. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE TnI EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DE ESTUDIO.

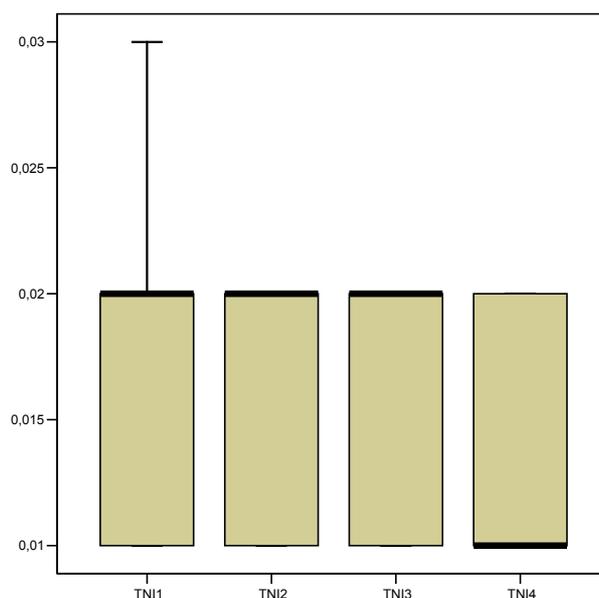


FIGURA 87. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE TnI EN LOS DIFERENTES MOMENTOS.

En la figura 87 se observa como los niveles de TnI en suero se mantienen constantes durante las diferentes tomas realizadas, no variando prácticamente nada sus medias, siendo los mismos valores detectados de TnI en el suero de los jugadores de balonmano, tanto antes del test como a las 24 horas de haberlo finalizado.

En la figura 88 podemos ver representados los valores medios de TnI y su evolución a lo largo del estudio realizado.

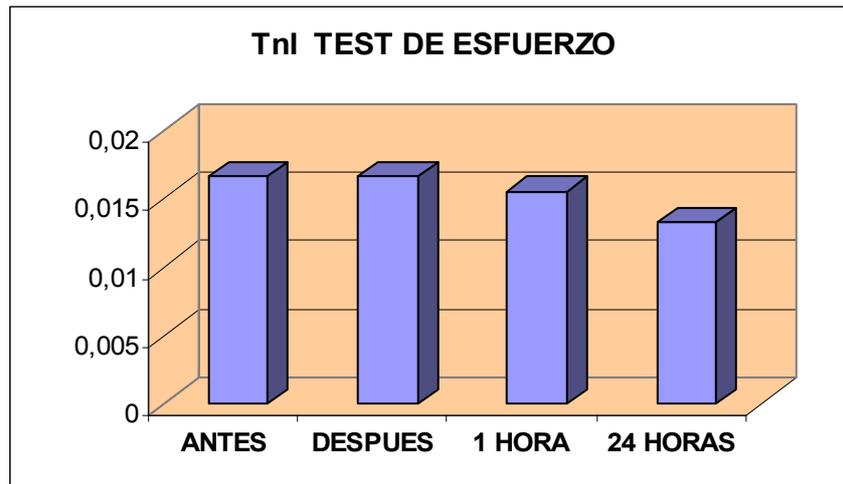


FIGURA 88. NIVELES MEDIOS DE TnI ANTES, DESPUÉS, 1 HORA Y 24 HORAS DEPUÉS DEL TEST DE ESFUERZO.

#### 4.5. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE TnT.

En la tabla 54 se observa la liberación de TnT detectada en suero antes, después, una hora y 24 horas después del un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante del grupo de estudio (jugadores de balonmano). En la primera toma realizada antes del test de esfuerzo, la concentración media de TnT fue de 0,001 ng/mL, la realizada después del test de 0,0388 ng/mL, en la tercera toma, realizada a la hora de haber terminado el test se detectó una concentración media de TnT de 0,0389 ng/mL y en la última toma realizada a las 24 horas se detectó unos niveles de 0,0389 ng/mL de TnT en suero de los deportistas analizados.

TnT ng/mL	TEST DE ESFUERZO EN TAPIZ RODANTE			
	ANTES	DESPUES	1 HORA	24 HORAS
<b>MEDIAS</b>	0,001333	0,038889	0,0389	0,0389
<b>DESVIACION TIPICA</b>	0,0007	0,0105	0,0105	0,0105

TABLA 54. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE TnT EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DE ESTUDIO.

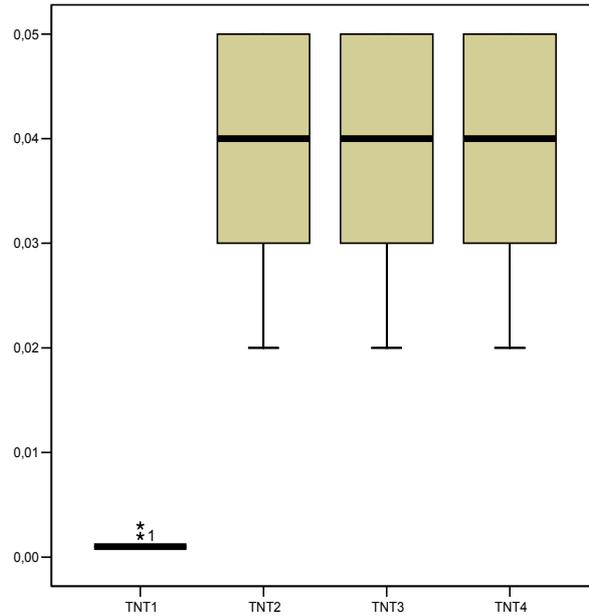


FIGURA 89. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE TnT EN LOS DIFERENTES MOMENTOS.

En la figura 89 se observa como los niveles de TnT en suero se elevan en la segunda toma con respecto a la primera, este ascenso que se produce en la segunda toma, que se realiza justo al terminar el test de esfuerzo, se mantiene ya en todas las demás tomas sucesivas, no variando los niveles de TnT en suero ni en la tercera ni en la cuarta toma realizada a los deportistas a las 24 horas de la finalización del test.

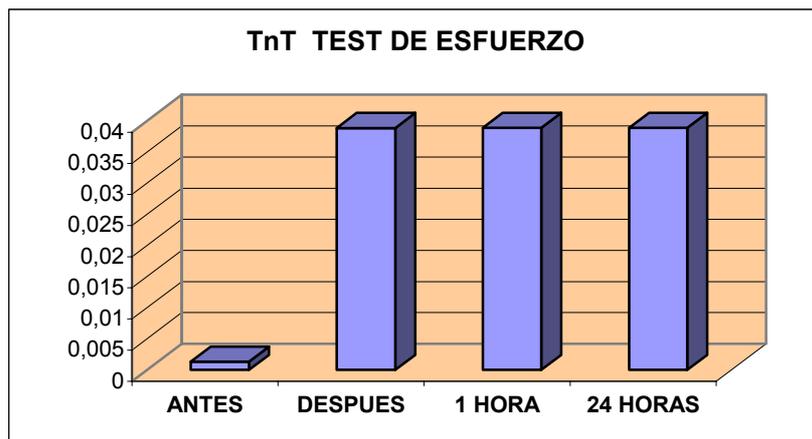


FIGURA 90. NIVELES MEDIOS DE TnT ANTES, DESPUÉS, 1 HORA Y 24 HORAS DEPUÉS DEL TEST DE ESFUERZO.

En la figura 90 podemos ver representados los valores medios de TnT y su evolución a lo largo del estudio realizado.

#### 4.6. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ALFA ACTINA.

En la tabla 55 se observa la liberación de  $\alpha$ -actina detectada en suero antes, después, una hora y 24 horas después del un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante del grupo de estudio (jugadores de balonmano). En la primera toma realizada antes del test de esfuerzo, la concentración media de  $\alpha$ -actina fue de 8,243  $\mu$ gr/ml, la realizada después del test de 15,34  $\mu$ gr/ml, en la tercera toma, realizada a la hora de haber terminado el test se detectó una concentración media de  $\alpha$ -actina de 12,13  $\mu$ gr/ml y en la última toma realizada a las 24 horas se detectó unos niveles de 7,7689  $\mu$ gr/ml de C en suero de los deportistas analizados.

ACTINA ( $\mu$ gr/ml)	TEST DE ESFUERZO EN TAPIZ RODANTE			
	ANTES	DESPUES	1 HORA	24 HORAS
MEDIAS	8,2433	15,3444	12,1356	7,7689
DESVIACION TIPICA	5,048	7,964	4,551	2,470

TABLA 55. CUADRO RESUMEN DE LOS VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN TÍPICA DE ACTINA EN LOS DIFERENTES MOMENTOS DE ESTUDIO.

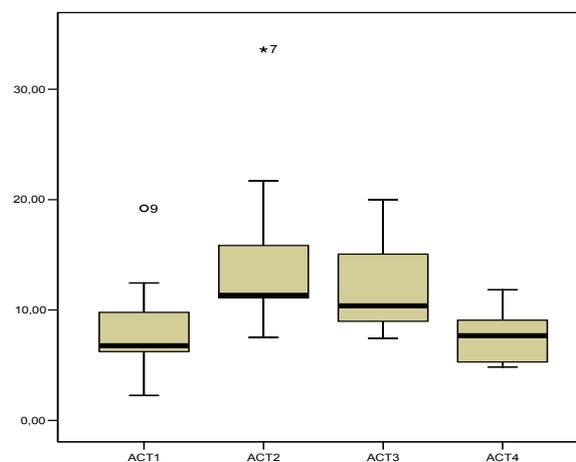


FIGURA 91. DIAGRAMA DE CAJAS DE LOS NIVELES DE ACTINA EN LOS DIFERENTES MOMENTOS.

En la figura 91 se observa como los niveles de  $\alpha$ -actina en suero se elevan en la segunda toma con respecto a la primera. Podemos ver en la imagen como en la segunda toma es en donde más se libera  $\alpha$ -actina en el suero de los deportistas, que en la tercera toma realizada una hora después del esfuerzo los niveles de  $\alpha$ -actina empiezan ya a bajar, poniendo se casi al nivel del principio en la última toma que se realizó a las 24 horas del test.

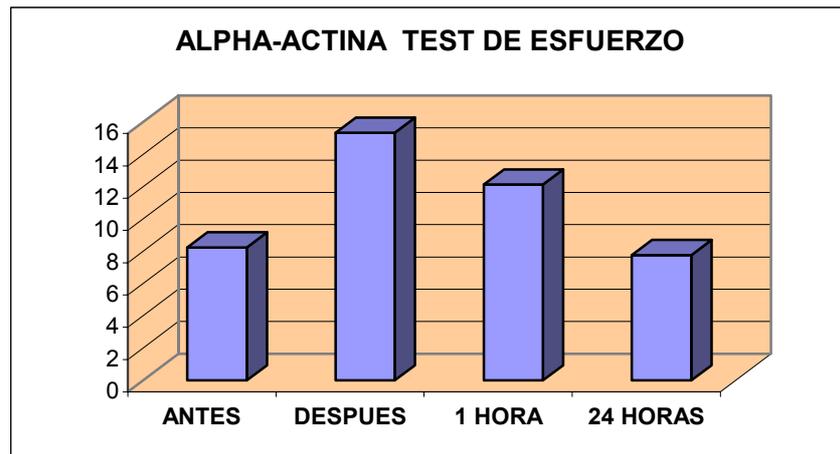


FIGURA 92. NIVELES MEDIOS DE ACTINA ANTES, DESPUÉS, 1 HORA Y 24 HORAS DEPUÉS DEL TEST DE ESFUERZO.

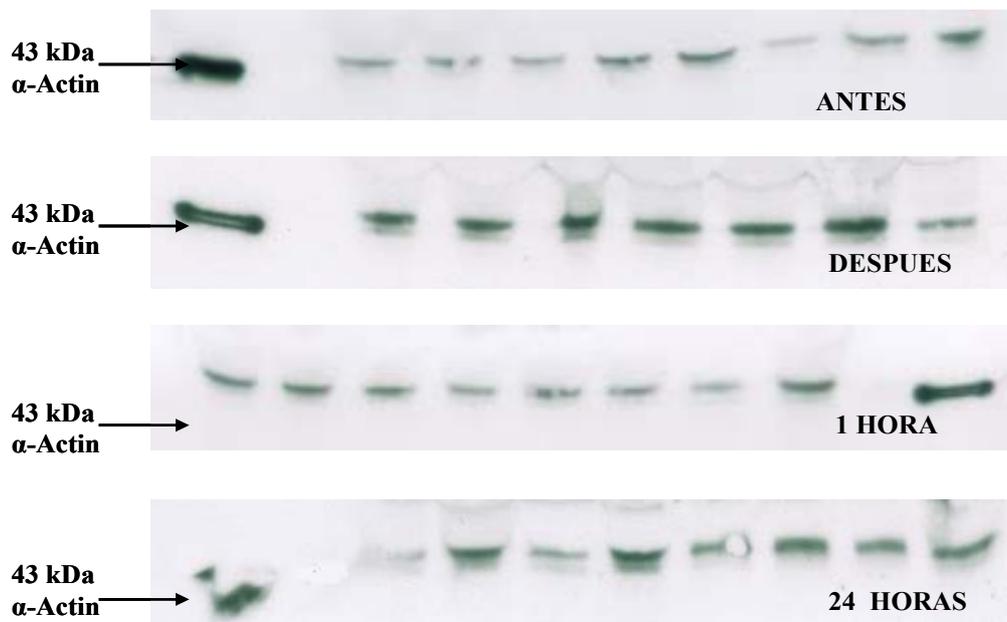


FIGURA 93. A. DETERMINACIÓN POR INMUNOBLOTING DE LOS NIVELES DE A-ACTINA EN LOS DIFERENTES MOMENTOS, EN LA PRÁCTICA DE UN TEST DE ESFUERZO MÁXIMO.

En la figura 93 se observan los niveles de  $\alpha$ -actina en suero de los jugadores de balonmano en las diferentes situaciones de estudio, con una banda al nivel de 43 kDa. Podemos ver cuatro geles correspondiéndose cada uno a cada situación de estudio.

#### 4.7. RESUMEN DE LOS NIVELES DE LAS VARIABLES DENTRO DE CADA GRUPO.

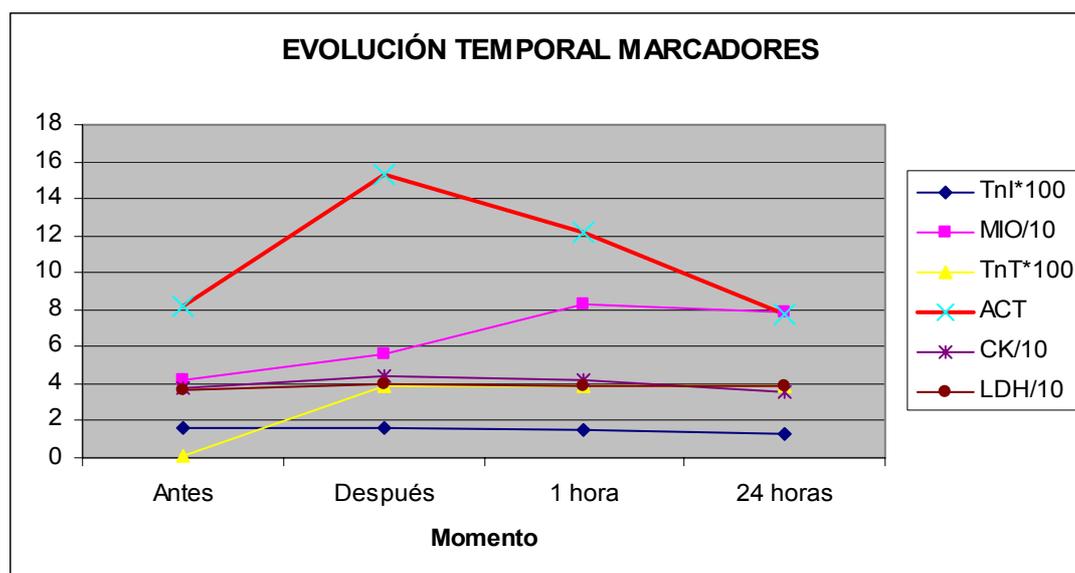


FIGURA 94. EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LO MARCADORES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.

En la figura 94 se puede observar la liberación de todas las variables en relación con los cuatro momentos de estudio. En la imagen se ve reflejado claramente como la actina es el marcador que obtiene valores más altos de liberación siendo el marcador que más se eleva después del test de esfuerzo (subgrupo 1).

#### 4.8. ANALISIS INFERENCIAL DEL CUARTO ESTUDIO.

En la tabla 56 todas las variables dependientes (VD) las cuales consideramos globalmente, observando todos los resultados significativos ( $p < 0.001$ ).

Efecto intra-sujetos		Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Significación	Eta al cuadrado parcial	Potencia observada(a)
momento	Traza de Pillai	2,008	7,082	18,000	63,000	,000	,669	1,000
	Lambda de Wilks	,005	16,950	18,000	54,225	,000	,832	1,000
	Traza de Hotelling	35,634	34,974	18,000	53,000	,000	,922	1,000
	Raíz mayor de Roy	31,391	109,868(b)	6,000	21,000	,000	,969	1,000

a Calculado con alfa = ,05

**TABLA 56. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DEL EFECTO INTRA-SUJETOS.**

Fuente	Medida		Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial	Potencia observada(a)
momento	tni	Esfericidad asumida	6,667E-05	3	2,222E-05	,842	,484	,095	,205
		Greenhouse-Geisser	6,667E-05	2,124	3,139E-05	,842	,454	,095	,174
		Huynh-Feldt	6,667E-05	2,912	2,289E-05	,842	,482	,095	,202
		Límite-inferior	6,667E-05	1,000	6,667E-05	,842	,386	,095	,128
	mio	Esfericidad asumida	10197,305	3	3399,102	13,869	,000	,634	1,000
		Greenhouse-Geisser	10197,305	1,472	6925,647	13,869	,001	,634	,971
		Huynh-Feldt	10197,305	1,724	5915,967	13,869	,001	,634	,985
		Límite-inferior	10197,305	1,000	10197,305	13,869	,006	,634	,902
	tnt	Esfericidad asumida	,010	3	,003	109,639	,000	,932	1,000
		Greenhouse-Geisser	,010	1,000	,010	109,639	,000	,932	1,000
		Huynh-Feldt	,010	1,000	,010	109,639	,000	,932	1,000
		Límite-inferior	,010	1,000	,010	109,639	,000	,932	1,000
	act	Esfericidad asumida	343,247	3	114,416	7,300	,001	,477	,964
		Greenhouse-Geisser	343,247	1,512	227,065	7,300	,012	,477	,800
		Huynh-Feldt	343,247	1,789	191,908	7,300	,008	,477	,852
		Límite-inferior	343,247	1,000	343,247	7,300	,027	,477	,659
	ck	Esfericidad asumida	35948,306	3	11982,769	10,855	,000	,576	,997
		Greenhouse-Geisser	35948,306	1,348	26663,902	10,855	,005	,576	,905
		Huynh-Feldt	35948,306	1,523	23596,344	10,855	,003	,576	,932
		Límite-inferior	35948,306	1,000	35948,306	10,855	,011	,576	,822
ldh	Esfericidad asumida	4405,667	3	1468,556	,570	,640	,066	,150	
	Greenhouse-Geisser	4405,667	1,676	2629,265	,570	,549	,066	,120	
	Huynh-Feldt	4405,667	2,068	2130,100	,570	,582	,066	,130	
	Límite-inferior	4405,667	1,000	4405,667	,570	,472	,066	,103	

**TABLA 57. ANÁLISIS DE CONTRASTES UNIVARIADOS**

En la tabla 57 observamos significatividad para ( $p < 0.001$ ) de 4 variables dependientes VDs (MIO, TnT, ACT y CK) y no encontrando significatividad en las variables Tni y LDH. Por lo tanto, a continuación vamos a estudiar las diferencias entre esas cuatro medias (una para cada momento) y ver entre cuales hay diferencias significativas (Tabla 58).

Medida	(I) momento	(J) momento	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significaci ón(a)	Intervalo de confianza al 95 % para diferencia(a)	
						Límite inferior	Límite superior
<b>MIOGLOB</b>	1	2	-14,467(*)	5,044	<b>,021</b>	-26,099	-2,834
		3	-41,422(*)	10,634	<b>,005</b>	-65,945	-16,899
		4	-36,856(*)	6,553	<b>,000</b>	-51,966	-21,745
	2	1	14,467(*)	5,044	<b>,021</b>	2,834	26,099
		3	-26,956(*)	9,342	<b>,020</b>	-48,498	-5,413
		4	-22,389(*)	5,572	<b>,004</b>	-35,238	-9,540
	3	1	41,422(*)	10,634	<b>,005</b>	16,899	65,945
		2	26,956(*)	9,342	<b>,020</b>	5,413	48,498
		4	4,567	5,196	,405	-7,414	16,548
	4	1	36,856(*)	6,553	<b>,000</b>	21,745	51,966
		2	22,389(*)	5,572	<b>,004</b>	9,540	35,238
		3	-4,567	5,196	,405	-16,548	7,414
<b>TnT</b>	1	2	-,038(*)	,004	,000	-,046	-,029
		3	-,038(*)	,004	,000	-,046	-,029
		4	-,038(*)	,004	,000	-,046	-,029
	2	1	,038(*)	,004	,000	,029	,046
		3	,000	,000	.	,000	,000
		4	,000	,000	.	,000	,000
	3	1	,038(*)	,004	,000	,029	,046
		2	,000	,000	.	,000	,000
		4	,000	,000	.	,000	,000
	4	1	,038(*)	,004	,000	,029	,046
		2	,000	,000	.	,000	,000
		3	,000	,000	.	,000	,000
<b>ACT</b>	1	2	-7,101(*)	2,758	<b>,033</b>	-13,461	-7,741
		3	-3,892(*)	,878	<b>,002</b>	-5,917	-1,867
		4	,474	1,453	,752	-2,875	3,824
	2	1	7,101(*)	2,758	<b>,033</b>	,741	13,461
		3	3,209	2,106	,166	-1,648	8,066
		4	7,576(*)	2,102	<b>,007</b>	2,727	12,424
	3	1	3,892(*)	,878	<b>,002</b>	1,867	5,917
		2	-3,209	2,106	,166	-8,066	1,648
		4	4,367(*)	1,246	<b>,008</b>	1,494	7,240
	4	1	-,474	1,453	,752	-3,824	2,875
		2	-7,576(*)	2,102	<b>,007</b>	-12,424	-2,727
		3	-4,367(*)	1,246	<b>,008</b>	-7,240	-1,494
<b>ck</b>	1	2	-58,778(*)	10,744	<b>,001</b>	-83,554	-34,002
		3	-45,444(*)	8,743	<b>,001</b>	-65,607	-25,282
		4	18,111	16,981	,317	-21,047	57,269
	2	1	58,778(*)	10,744	<b>,001</b>	34,002	83,554
		3	13,333	6,677	,081	-2,064	28,731
		4	76,889(*)	23,226	<b>,011</b>	23,329	130,449
	3	1	45,444(*)	8,743	<b>,001</b>	25,282	65,607
		2	-13,333	6,677	,081	-28,731	2,064
		4	63,556(*)	20,187	<b>,014</b>	17,003	110,108
	4	1	-18,111	16,981	,317	-57,269	21,047
		2	-76,889(*)	23,226	<b>,011</b>	-130,449	-23,329
		3	-63,556(*)	20,187	<b>,014</b>	-110,108	-17,003

TABLA 58. ANÁLISIS DE COMPARACIONES POR PARES

Realizamos las comparaciones por pares de cada variable dependiente para cada momento, y observamos que hay diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en tres VDs (MIO, ACT y CK). La diferencia de las medias es significativa al nivel 0,05 (Tabla 58).

En la tabla 58 observamos la siguiente significatividad de las variables entre los diferentes momentos de estudio. En la VD *Mioglobina* observamos como la primera toma es menor que la segunda y la segunda a su vez menor que la tercera y siendo la tercera igual que la cuarta ( $Mom1 < Mom2 < Mom3 = Mom4$ ). Crece desde el momento 1 hasta el 3 y luego se estabiliza

En la variable dependiente *TnT*, observamos que existe un problema con esta variable, es que no hay variabilidad entre los distintos sujetos. En la variable *Actina*, observamos que tiene significatividad ( $p < 0.001$ ) en el análisis de comparaciones, viendo como la primera toma es menor que la segunda y la segunda igual que la tercera y siendo la cuarta menor que la tercera y esta siendo igual que la primera ( $Mom1 < Mom2 = Mom3 > Mom4 = Mom1$ ). En resumen, crece la variable del momento 1 al 2 se estabiliza e el momento 3 y baja a niveles iniciales en el momento 4 (Tabla 58).

En la variable dependiente CK, observamos que tiene significatividad ( $p < 0.001$ ) en el análisis de comparaciones, viendo como crece la variable del momento 1 al 2, se estabiliza en el momento 3 y finalmente baja a niveles iniciales en el momento 4, igual que la variable dependiente ACT ( $Mom1 < Mom2 = Mom3 > Mom4 = Mom1$ ) (Tabla 58).

En el resto de variables no encontramos diferencias significativas a través de los diferentes momentos de estudio.

Finalmente además del análisis de las comparaciones hemos realizado lo que se denomina un análisis de tendencias. Se realiza porque podemos ver la evolución de cada marcador a través del tiempo. Se contrasta cada evolución en los cuatro momentos con una función lineal (una Recta), una

función cuadrática (una campana o la inversa), o una función cúbica (si los datos crecieran-decieran-crecieran) (Tabla 18, Apéndice)

## 5. APÉNDICE

### ESTUDIO 1.

#### Correlaciones:

N=134		Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
<b>Tnl</b>	Pearson	1	,282(**)	,209(*)	,279(**)	,124	,157
	Sig. (bilateral)		,001	,016	,001	,154	,070
<b>MIO</b>	Pearson		1	,531(**)	,598(**)	,512(**)	,406(**)
	Sig. (bilateral)			,000	,000	,000	,000
<b>TnT</b>	Pearson			1	,307(**)	,152	,164
	Sig. (bilateral)				,000	,080	,059
<b>ACT</b>	Pearson				1	,511(**)	,729(**)
	Sig. (bilateral)					,000	,000
<b>CK</b>	Pearson					1	,432(**)
	Sig. (bilateral)						,000
<b>LDH</b>	Pearson						1
	Sig. (bilateral)						

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

TABLA 1. CORRELACIONES EXISTENTES ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.

#### Supuestos del análisis para un MANOVA:

		Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
N		134	134	134	134	134	134
Par. normales(a,b)	Media	,022649	249,0094	,023119	12,2848	635,7761	298,4328
	DT	,02040	570,8346	,0532970	15,8415	1349,4612	206,1176
Dif más extremas	Absoluta	,246	,378	,352	,243	,323	,113
	Positiva	,246	,378	,352	,243	,304	,113
	Negativa	-,171	-,335	-,332	-,219	-,323	-,082
Z de Kolmogorov-Smirnov		2,844	4,378	4,071	2,817	3,736	1,308
Sig. asintót. (bilateral)		,000	,000	,000	,000	,000	,065

TABLA 2. NORMALIDAD DE LAS VARIABLES: PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA UNA MUESTRA

	F	gl1	gl2	Significación
<b>Tnl</b>	10,013	3	130	,000
<b>MIO</b>	40,351	3	130	,000
<b>TnT</b>	13,851	3	130	,000
<b>ACT</b>	27,749	3	130	,000
<b>CK</b>	28,586	3	130	,000
<b>LDH</b>	34,623	3	130	,000

TABLA 3. CONTRASTE DE LEVENE SIGNIFICATIVO PARA TODAS LAS VARIABLES (MAYOR DE 0.0001)

## ESTUDIO 2.

### Correlaciones:

N=43		Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
<b>Tnl</b>	Pearson	<b>1</b>	<b>-,177</b>	<b>-,013</b>	<b>-,068</b>	<b>-,078</b>	<b>,000</b>
	Sig. (bilateral)		,255	,936	,663	,618	,999
<b>MIO</b>	Pearson		<b>1</b>	<b>,188</b>	<b>-,102</b>	<b>,132</b>	<b>-,209</b>
	Sig. (bilateral)			,227	,513	,400	,179
<b>TnT</b>	Pearson			<b>1</b>	<b>-,303(*)</b>	<b>-,314(*)</b>	<b>-,551(**)</b>
	Sig. (bilateral)				,048	,041	,000
<b>ACT</b>	Pearson				<b>1</b>	<b>,342(*)</b>	<b>,276</b>
	Sig. (bilateral)					,025	,073
<b>CK</b>	Pearson					<b>1</b>	<b>,468(**)</b>
	Sig. (bilateral)						,002
<b>LDH</b>	Pearson						<b>1</b>
	Sig. (bilateral)						

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

\* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

TABLA 4. CORRELACIONES EXISTENTES ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.

### Supuestos del análisis para un MANOVA:

		Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
N		43	43	43	43	43	43
Parámetros normales(a,b)	Media	,017674	41,165116	,008047	3,87023	242,976	298,465116
	DT	,0084	14,7367	,0102	5,1473	129,7788	79,1741
Diferencias más extremas	Absoluta	,261	,134	,336	,230	,165	,179
	Positiva	,261	,134	,336	,227	,165	,104
	Negativa	-,181	-,073	-,246	-,230	-,065	-,179
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,713	,877	2,201	1,505	1,080	1,174
Sig. asintót. (bilateral)		,006	,425	,000	,022	,194	,127

TABLA 5. NORMALIDAD DE LAS VARIABLES: PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA UNA MUESTRA

	F	gl1	gl2	Significación
Tnl	,529	2	40	,593
MIO	4,196	2	40	,022
TnT	3,077	2	40	,057
ACT	13,922	2	40	,000
CK	1,336	2	40	,274
LDH	8,536	2	40	,001

TABLA 6. CONTRASTE DE LEVENE SIGNIFICATIVO PARA TODAS LAS VARIABLES (MAYOR DE 0.0001)

### U de Mann-Whitney para comparaciones por pares.

#### 1-2) Balonmano-Rugby. Estadísticos de contraste (b)

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	68,000	54,500	78,000	17,000	31,000	66,000
W de Wilcoxon	123,000	109,500	133,000	72,000	86,000	202,000
Z	-,689	-,345	-,190	-,320	-,583	-,738
Sig. asintót. (bilateral)	,491	,179	,849	,001	,010	,460
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,551(a)	,182(a)	,938(a)	,000(a)	,009(a)	,484(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: GR

TABLA 7. ESTADISTICO DE CONTRASTE DE LAS VARIABLES ENTRE LOS GRUPO BALONMANO Y RUGBY.

#### (1-3) Balonmano-Individual. Estadísticos de contraste (b)

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	134,000	121,000	31,500	27,000	19,000	20,000
W de Wilcoxon	270,000	257,000	167,500	180,000	172,000	173,000
Z	-,078	-,541	-,033	-,927	-,215	-,179
Sig. asintót. (bilateral)	,938	,589	,000	,000	,000	,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,958(a)	,606(a)	,000(a)	,000(a)	,000(a)	,000(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: GR

TABLA 8. ESTADISTICO DE CONTRASTE DE LAS VARIABLES ENTRE LOS GRUPO BALONMANO Y DEPORT. INDIVID.

#### (2-3) Rugby-Individual. Estadísticos de contraste(b)

	Tnl	MIO	TnT	ACT	CK	LDH
U de Mann-Whitney	71,000	54,500	17,000	49,000	25,000	13,500
W de Wilcoxon	126,000	109,500	72,000	202,000	178,000	166,500
Z	-,762	-,532	-,359	-,808	-,013	-,592
Sig. asintót. (bilateral)	,446	,126	,000	,071	,003	,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,505(a)	,127(a)	,000(a)	,074(a)	,002(a)	,000(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: GR

TABLA 9. ESTADISTICO DE CONTRASTE DE LAS VARIABLES ENTRE LOS GRUPO RUGBY Y DEPORT. INDIV.

## ESTUDIO 3.

Correlaciones:

		MIO	TNT	ACT	CK	LDH	TNI 2	MIO2	TNT2	ACT2	CK2	LDH2
<b>TNI</b>	Pearson	,028	-,189	,063	,118	,097	-,039	,133	,169	,148	,066	-,058
	Sig. (bilateral)	,899	,388	,774	,592	,660	,861	,547	,441	,502	,763	,792
<b>MIO</b>	Pearson	1	,322	-,123	,647* *	,359	,181	,267	,044	-,184	,698* *	,182
	Sig. (bilateral)		,134	,575	,001	,093	,408	,217	,843	,399	,000	,406
<b>TNT</b>	Pearson		1	-,146	,758* *	,232	,188	,087	-,048	-,049	,752* *	,060
	Sig. (bilateral)			,506	,000	,286	,391	,691	,829	,823	,000	,785
<b>ACT</b>	Pearson			1	-,135	-,274	-,138	-,436( *)	,694**	,292	-,286	-,452*
	Sig. (bilateral)				,539	,206	,530	,037	,000	,177	,186	,030
<b>CK</b>	Pearson				1	,422* *	,249	,124	,106	,018	,929* *	,022
	Sig. (bilateral)					,045	,252	,572	,631	,937	,000	,919
<b>LDH</b>	Pearson					1	,006	,407	-,339	-,188	,510* *	,702* *
	Sig. (bilateral)						,977	,054	,114	,390	,013	,000
<b>TNI2</b>	Pearson						1	,175	,087	-,025	,311	-,052
	Sig. (bilateral)							,424	,692	,909	,148	,814
<b>MIO</b>	Pearson							1	-,568**	-,445*	,413	,681* *
	Sig. (bilateral)								,005	,033	,050	,000
<b>TNT2</b>	Pearson								1	,289	-,105	-,687* *
	Sig. (bilateral)									,181	,635	,000
<b>ACT2</b>	Pearson									1	-,108	-,292
	Sig. (bilateral)										,624	,176
<b>CK2</b>	Pearson										1	,322
	Sig. (bilateral)											,134
<b>LDH2</b>	Pearson											1
	Sig. (bilateral)											

TABLA 10. CORRELACIONES EXISTENTES ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.

**Supuestos del análisis para un MANOVA:**

Efecto	Razón de verosimilitud	Chi-cuadrado aprox.	gl	Significación
<b>Entre sujetos</b>	,000	816,468	20	,000
<b>Intra-sujetos mom</b>	,000	691,443	20	,000

TABLA 11. PRUEBA DE ESFERICIDAD DE BARLETT(A)

	TNI	MIOGL	TNT	ACTINA	CK	LDH
N	23	23	23	23	23	23
Media	,017826	34,6173	,002261	4,594348	276,7826	337,1304
Parámetros normales(a,b) DT	,00902	10,55102	,00604	5,17401	125,4504	33,64832
Diferencias más extremas Absoluta	,285	,094	,539	,229	,178	,149
Positiva	,285	,094	,539	,229	,178	,149
Negativa	-,193	-,072	-,417	-,199	-,149	-,081
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,369	,452	2,585	1,098	,855	,715
Sig. asintót. (bilateral)	,047	,987	,000	,179	,458	,686

TABLA 12. SUPUESTO DE NORMALIDAD: PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA UNA MUESTRA. ANTES DEL PARTIDO.

		TNI2	MIOGLOB2	TNT2	ACT2	CK2	LDH2
N		23	23	23	23	23	23
Parámetros normales(a,b)	Media	,017826	230,239130	,023783	23,6782	401,6086	440,8695
	DT	,0141282	128,9902	,0172810	8,64517	158,4908	76,69734
Diferencias más extremas	Absoluta	,319	,154	,182	,145	,189	,159
	Positiva	,319	,154	,182	,144	,189	,159
	Negativa	-,290	-,111	-,174	-,145	-,131	-,096
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,529	,739	,873	,694	,906	,761
Sig. asintót. (bilateral)		<b>,019</b>	,646	,431	,721	,385	,609

**TABLA 13. SUPUESTO DE NORMALIDAD: PRUEBA DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA UNA MUESTRA. DESPUÉS DEL PARTIDO.**

	F	gl1	gl2	Significación
<b>TNI1</b>	,002	1	21	,964
<b>TNI2</b>	,120	1	21	,732
<b>MIO1</b>	3,495	1	21	,076
<b>MIO2</b>	4,747	1	21	<b>,041</b>
<b>TNT1</b>	3,622	1	21	,071
<b>TNT2</b>	9,520	1	21	,006
<b>ACT1</b>	13,663	1	21	<b>,001</b>
<b>ACT2</b>	,903	1	21	,353
<b>CK1</b>	1,994	1	21	,173
<b>CK2</b>	,826	1	21	,374
<b>LDH1</b>	,453	1	21	,508
<b>LDH2</b>	1,951	1	21	,177

**TABLA 14. CONTRASTE DE LEVENE SOBRE LA IGUALDAD DE LAS VARIANZAS ERROR(A)**

**Contrastes univariados Para la VI intrasujeto (momento) y para la interacción**

Fuente	Medida		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial	Potencia observada (a)
<b>mom</b>	<b>tnt</b>	Esfericidad asumida	,000	1	,000	,000	1,000	,000	,050
		Greenhouse-Geisser	,000	1,000	,000	,000	1,000	,000	,050
		Huynh-Feldt	,000	1,000	,000	,000	1,000	,000	,050
		Límite-inferior	,000	1,000	,000	,000	1,000	,000	,050
	<b>mio</b>	Esfericidad asumida	481805,829	1	481805,829	102,883	,000	,830	1,000
		Greenhouse-Geisser	481805,829	1,000	481805,829	102,883	,000	,830	1,000
		Huynh-Feldt	481805,829	1,000	481805,829	102,883	,000	,830	1,000
		Límite-inferior	481805,829	1,000	481805,829	102,883	,000	,830	1,000
	<b>tnt</b>	Esfericidad asumida	,004	1	,004	58,197	,000	,735	1,000
		Greenhouse-Geisser	,004	1,000	,004	58,197	,000	,735	1,000
		Huynh-Feldt	,004	1,000	,004	58,197	,000	,735	1,000
		Límite-inferior	,004	1,000	,004	58,197	,000	,735	1,000
	<b>act</b>	Esfericidad asumida	4102,774	1	4102,774	103,938	,000	,832	1,000
		Greenhouse-Geisser	4102,774	1,000	4102,774	103,938	,000	,832	1,000
		Huynh-Feldt	4102,774	1,000	4102,774	103,938	,000	,832	1,000
		Límite-inferior	4102,774	1,000	4102,774	103,938	,000	,832	1,000
<b>ck</b>	Esfericidad asumida	186336,315	1	186336,315	113,704	,000	,844	1,000	
	Greenhouse-Geisser	186336,315	1,000	186336,315	113,704	,000	,844	1,000	
	Huynh-Feldt	186336,315	1,000	186336,315	113,704	,000	,844	1,000	
	Límite-inferior	186336,315	1,000	186336,315	113,704	,000	,844	1,000	
<b>ldh</b>	Esfericidad asumida	134724,324	1	134724,324	159,866	,000	,884	1,000	
	Greenhouse-Geisser	134724,324	1,000	134724,324	159,866	,000	,884	1,000	
	Huynh-Feldt	134724,324	1,000	134724,324	159,866	,000	,884	1,000	
	Límite-inferior	134724,324	1,000	134724,324	159,866	,000	,884	1,000	
<b>mom*</b> <b>grupo</b>	<b>tnt</b>	Esfericidad asumida	,000	1	,000	,000	1,000	,000	,050
		Greenhouse-Geisser	,000	1,000	,000	,000	1,000	,000	,050
		Huynh-Feldt	,000	1,000	,000	,000	1,000	,000	,050

	Límite-inferior	,000	1,000	,000	,000	1,000	,000	,050
<b>mio</b>	Esfericidad asumida	77895,862	1	77895,862	16,634	,001	,442	,973
	Greenhouse-Geisser	77895,862	1,000	77895,862	16,634	,001	,442	,973
	Huynh-Feldt	77895,862	1,000	77895,862	16,634	,001	,442	,973
	Límite-inferior	77895,862	1,000	77895,862	16,634	,001	,442	,973
<b>tnt</b>	Esfericidad asumida	,002	1	,002	29,387	,000	,583	,999
	Greenhouse-Geisser	,002	1,000	,002	29,387	,000	,583	,999
	Huynh-Feldt	,002	1,000	,002	29,387	,000	,583	,999
	Límite-inferior	,002	1,000	,002	29,387	,000	,583	,999
<b>act</b>	Esfericidad asumida	,723	1	,723	,018	,894	,001	,052
	Greenhouse-Geisser	,723	1,000	,723	,018	,894	,001	,052
	Huynh-Feldt	,723	1,000	,723	,018	,894	,001	,052
	Límite-inferior	,723	1,000	,723	,018	,894	,001	,052
<b>ck</b>	Esfericidad asumida	8432,141	1	8432,141	5,145	,034	,197	,581
	Greenhouse-Geisser	8432,141	1,000	8432,141	5,145	,034	,197	,581
	Huynh-Feldt	8432,141	1,000	8432,141	5,145	,034	,197	,581
	Límite-inferior	8432,141	1,000	8432,141	5,145	,034	,197	,581
<b>ldh</b>	Esfericidad asumida	19591,802	1	19591,802	23,248	,000	,525	,996
	Greenhouse-Geisser	19591,802	1,000	19591,802	23,248	,000	,525	,996
	Huynh-Feldt	19591,802	1,000	19591,802	23,248	,000	,525	,996
	Límite-inferior	19591,802	1,000	19591,802	23,248	,000	,525	,996

a Calculado con alfa = ,05

**TABLA 15. EFECTO DE CADA VI Y DE LA INTERACCIÓN POR SEPARADO PARA CADA VD.**

## ESTUDIO 4.

Supuestos del análisis para un MANOVA:

Efecto	Razón de verosimilitud	Chi-cuadrado aprox.	gl	Significación
Entre sujetos	,000	272,969	20	<b>,000</b>
Intra-sujetos momento	,000	823,700	20	<b>,000</b>

TABLA 16. PRUEBA DE ESFERICIDAD DE BARLETT

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Significación	Epsilon(a)		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
momento	,514	4,478	5	,487	,708	,971	,333
tni	,146	12,951	5	<b>,025</b>	,491	,575	,333
mio	,000	.	5	.	,333	,333	,333
tnt	,111	14,760	5	<b>,012</b>	,504	,596	,333
act	,107	15,025	5	<b>,011</b>	,449	,508	,333
ck	,202	10,736	5	,059	,559	,689	,333
ldh							

TABLA 17. PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY (B)

Pruebas de contrastes intra-sujetos

Fuente	Medida	momento	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad	Potencia observada(a)	
	mio	Lineal	8510,563	1	8510,563	25,257	<b>,001</b>	,759	25,257	,992	
		Cuadrático	815,102	1	815,102	5,458	<b>,048</b>	,406	5,458	,537	
		Cúbico	871,640	1	871,640	3,501	,098	,304	3,501	,378	
	tnt	Lineal	,006	,006	1	,006	109,639	<b>,000</b>	,932	109,639	1,000
		Cuadrático	,003	,003	1	,003	109,639	<b>,000</b>	,932	109,639	1,000
		Cúbico	,001	,001	1	,001	109,639	<b>,000</b>	,932	109,639	1,000
	act	Lineal	9,656	9,656	1	9,656	1,862	,210	,189	1,862	,226
		Cuadrático	295,897	295,897	1	295,897	16,852	<b>,003</b>	,678	16,852	,947
		Cúbico	37,693	37,693	1	37,693	1,553	,248	,163	1,553	,196
	ck	Lineal	2060,450	2060,450	1	2060,450	1,569	,246	,164	1,569	,198
		Cuadrático	33672,250	33672,250	1	33672,250	18,569	<b>,003</b>	,699	18,569	,963
		Cúbico	215,606	215,606	1	215,606	1,166	,312	,127	1,166	,159

TABLA 18. ANÁLISIS DE CONTRASTES INTRA-SUJETO



## **VI. DISCUSIÓN**

En la actualidad y dentro del terreno deportivo el diagnóstico del daño muscular esquelético tiene grandes interrogantes, las cuales nos planteamos al iniciar este estudio y línea de investigación:

La primera interrogante y de la cual se debe partir antes de iniciar cualquier línea de investigación fue, ¿existen marcadores fieles, fiables, sensibles y reproducibles de las lesiones musculares? Otra interrogante que nos planteamos fue, ¿las variaciones de estos marcadores biológicos se correlacionan con la gravedad de las lesiones histológicas? Y por último nos planteamos una de las interrogantes que creemos que es la más difícil de resolver y valorar, ¿el aumento de estos marcadores está asociado a un estado de sobreentrenamiento del deportista o a una lesión específica?

De estas interrogantes solo tenemos claro que el ejercicio físico intenso induce lesiones de las fibras musculares, de las que la gravedad depende de la duración del ejercicio, sus características y de la etapa de entrenamiento en la que se encuentre el deportista (Asp *et al.*, 1996)

El predominio de las lesiones musculares en el ejercicio es muy difícil de considerar a nivel clínico, estas lesiones estructurales cuya gravedad y evolución son muy variables, se caracterizan del lo más a menos posible por simples dolores remanentes de las masas musculares, a veces por una sensación de pesadez persistente de los miembros inferiores (Ebbeling *et al.*, 1989). La expresión clínica de esta patología es inespecífica y por consiguiente, su impacto en el terreno deportivo sigue siendo muy difícil de evaluar (Bigard *et al.*, 2001).

A nivel histológico, se ha venido observando que tras el ejercicio físico se produce un edema muscular, el cual contribuye al daño de la célula muscular (Komulainen *et al.*, 1993; Peeze Binkhorst *et al.*, 1990) probablemente por aumento del volumen celular y como consecuencia de ello, estiramiento y posterior ruptura de la membrana celular (Komulainen *et al.*, 1994). Este mismo autor encuentra, coincidiendo con otros, cambios ultraestructurales como disrupción de las líneas Z del sarcómero, pérdida de la

arquitectura miofibrilar y áreas subsarcolémicas ensanchadas. Otros autores establecen que los sarcómeros están unidos entre ellos por fibras de desmina que enlazan los distintos discos Z además de entre éstos con el sarcolema, estabilizando la membrana en el estrés mecánico y que como consecuencia del ejercicio excéntrico hay una pérdida de estas fibras de desmina (Koh, 2002). Si el músculo es estudiado unas horas después del ejercicio físico, además del daño mecánico descrito anteriormente, aparecen los cambios típicos del proceso de inflamación, con infiltración leucocitaria, etc.

Durante las últimas décadas se ha venido proponiendo que el ejercicio físico provoca un aumento de la producción de radicales libres por parte de los grupos musculares ejercitados (Brady *et al.*, 1979; Davies *et al.*, 1982; Dillard *et al.*, 1978; Jackson *et al.*, 1985; McArdle *et al.*, 2001; McArdle *et al.*, 1995; McArdle *et al.*, 1999; Sjödín *et al.*, 1990). Que estos radicales libres estén relacionados en la patogénesis del daño muscular asociado al ejercicio físico es un hecho que no está probado, aunque todas las hipótesis apuntan a su vinculación.

El indicador bioquímico más utilizado para valorar el daño muscular, son la medición de la liberación al plasma de las actividades plasmáticas de enzimas específicas del músculo, como la *creatina kinasa* (CK) y la *lactato deshidrogenasa* (LDH) se usan como marcadores de daño del tejido muscular (Apple *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1983; Lijnen *et al.*, 1988; Lott, 1984). La más utilizada es la CK, y hay otras, aparte de las citadas anteriormente, que son menos utilizadas como marcadores, como la GOT, la mioglobina y la anhidrasa carbónica III. La liberación de enzimas musculares en deportistas se usa para estimar la cantidad de daño muscular después de hacer ejercicio, basándose en la suposición de que la liberación de enzimas musculares se relaciona con la cantidad de enzimas musculares así como la cantidad de daño muscular provocado por el ejercicio (Appley *et al.*, 1988; Friden *et al.*, 1983; Janssen *et al.*, 1989).

Aunque sin embargo, en la actualidad, el marcador al que más valor se le está concediendo es al complejo de las troponinas, en especial a las

isoformas cardíacas de la Troponina T e I (cTnT y cTnI) (Wu *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 2000; Van De Werf *et al.*, 2003). Numerosos inmunoensayos automatizados con diferentes anticuerpos monoclonales se están comercializando. De acuerdo con los datos publicados, se considera que ambas troponinas tienen la misma sensibilidad y especificidad para la detección de daño miocárdico y para dar información pronóstica en el Síndrome Coronario Agudo (SCA) (Olatidoye *et al.*, 1998; Collinson, 1998; Ottani *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 2002)

En el caso de no disponer de las troponinas la mejor alternativa es como hemos dicho anteriormente, la CK-MM masa, que aunque presenta menor especificidad tiene demostrada su validez. El resto de marcadores como la CK total, LDH, GOT (AST), etc. no son recomendados (Alpert *et al.*, 2000). En los casos en los que la precocidad en el resultado sea determinante se recomienda usar marcadores de aparición precoz como la CK-MM y la mioglobina que se verán confirmados posteriormente con la elevación de un marcador más específico (troponinas).

➤ **Estudio 1. Modificaciones de los marcadores proteicos en los diferentes grupos de estudio.**

En este estudio, el primer parámetro analizado fue la mioglobina (Mb), este fue analizado en los diferentes grupos para ver las diferencias existentes en los niveles de dicha proteína en el suero circulante de los sujetos estudiados. Observándose grandes diferencias en los niveles de mioglobina entre el grupo de daño muscular con el resto de grupos estudiados. Siendo el nivel medio de mioglobina, en el grupo con daño muscular, de 891,8 ng/mL con respecto a los valores medios de los demás grupos que estaban comprendidos entre 28,86 y 50,23 ng/ml en suero circulante. Sin duda alguna los niveles altos de mioglobina en el grupo de traumatismo muscular se deben al daño muscular sufrido por los sujetos de dicho grupo. Esta proteína es considerada por varios autores como una proteína muy inespecífica, ya que se encuentra a nivel esquelético y cardíaco, y que se libera muy tempranamente a la sangre (Mair, 1999), según Mair esto se puede deber a que es una proteína

pequeña (Mioglobina tiene 17 kDa frente a los 80 kDa de la CK) y que tiene una ruta más directa en el endotelio microvascular apareciendo así en la sangre más rápidamente que las proteínas con un peso molecular más grande (Stephen *et al.*, 2003). En comparación con otras proteínas tales como la CK, su liberación al torrente sanguíneo es mucho más temprana, pudiendo llegar el nivel de CK a su pico más alto hasta 24 y 48 horas después del daño muscular o del ejercicio intenso (Clarkson, 1992). Newdy en diferentes trabajos nos dice que la mioglobina en su utilización junto con la CK-Mb y las troponinas puede ser un buen marcador de daño cardíaco no siéndolo como marcador de daño muscular esquelético (Newdy *et al.*, 2001).

Con respecto a los demás grupos los niveles de mioglobina detectados son valores que entran dentro de la normalidad (Clarkson *et al.*, 2002), siendo más elevados los niveles de mioglobina en el grupo de deportistas lesionados, pero no comparables a los del grupo de daño muscular severo, esto se puede deber a lo referido anteriormente, de al tratarse de una proteína pequeña su liberación es temprana y como consecuencia sus picos altos son tempranos (Mair, 1999),

También cabe destacar como los niveles de mioglobina en el grupo de deportistas de élite son mayores que los del grupo control, esto no lo explica claramente Clarkson en sus diferentes trabajos y otros autores, nos afirman que la práctica de ejercicio continuada ya sea de alta intensidad o no, hace que las proteínas musculares tales como la mioglobina (Mb) se liberen y aparezcan en la sangre, siendo esos niveles más altos que el de sujetos que no practican deporte (Clarkson *et al.*, 2002; Ebbeling *et al.*, 1989; Nosaka *et al.*, 1996)

En nuestro estudio hemos observado diferencias de la actividad de CK entre el grupo de sujetos con daño muscular con el resto de grupos analizados. Sin embargo según Kuipers dicha actividad no puede nunca considerarse como marcador fiable de daño muscular, puesto que la presencia de estas enzimas en el plasma no representa un reflejo fiel de la amplitud y la naturaleza de las lesiones musculares (Kuipers, 1993). ). La falta de sensibilidad y reproductividad de la actividad del CK conduce a considerar con mucha

prudencia las variaciones de este parámetro biológico. No es posible evaluar el alcance de las lesiones musculares inducidas por el ejercicio sobre la base de las solas variaciones de este parámetro (Bigard *et al.*, 1997; Bigard, 2001).

También podemos observar como los niveles de CK en el grupo de deportistas de élite (C) son mas altos que los del grupo de sujetos sanos (A), siendo mas altos incluso que el del grupo de deportistas lesionados (D), esto se puede deber a que algunas variables que influyen sobre el aumento de la actividad enzimática plasmática, como los niveles de estradiol (Bar, 1990; Bar y cols., 1988), el entrenamiento diario (Balnave *et al.*, 1993), el sexo (Van Der Meulen *et al.*, 1991) o la disciplina deportiva que practique (Hortobagyi *et al.*, 1989, Noakes, 1987, Popovich *et al.*, 1989).

Esos niveles altos de CK en los deportistas de elite, teniendo en cuenta que la toma es en reposo, se puede deber, como nos dice Balnave, al entrenamiento previo que esté llevando acabo dicho deportistas o al periodo de la temporada en la que se encuentra el deportistas. La actividad fue expresada en UI/L, que es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mmol de substrato por minuto. Estando los niveles de CK total del grupo control dentro del intervalo de confianza de una población clínicamente normal tal y como nos indica Szasz en 1976 (Szasz *et al.*, 1976).

Con estos reultados obtenidos, en los niveles de CK, en nuestro estudio nunca podremos hablar específicamente de daño muscular esquelético ya que los niveles elevados de creatinina kinasa total (CK) pueden estar asociados con lesiones del esqueleto, corazón y cerebro. Confirmandose todo esto con,lo que nos dice en sus trabajo Kuipers, que debido principalmente a la inespecificidad de la CK total, nunca podremos saber exactamente a que se debe esa elevación de los niveles de esta enzima (Kuipers, 1993).

Refiriendonos a los niveles de LDH, podemos observar como existen diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre los grupos de daño muscular severo y el grupo control. Y tambien existiendo diferencias entre el grupo control y los otros dos grupos (deportistas lesionados y sanos). En nuestros resultados, que

fueron tomados a nivel basal, vemos como los niveles en plasma de LDH del grupo de deportistas de élite son mucho mayores que los de grupo control, esto se puede considerar similar a lo publicado por Armstrong en 1983, los cuales muestran un incremento de alrededor del 100 %, pasando los valores de 130 U/L a 260 U/L, de sujetos deportistas a no deportistas. Produciéndose esas diferencias en los niveles por efecto del ejercicio.

Aunque menos utilizado que la actividad CK, la actividad LDH también se utiliza como marcador de daño muscular (Apple *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1983). Komulainen en diferentes trabajos realizados nos muestra la utilización de dicho marcador y su variación en los niveles tras la realización de un ejercicio físico intenso, observándose un incremento del 85 % aproximadamente en los niveles de LDH en plasma de los deportistas (Komulainen *et al.*, 1994).

Pero como hasta ahora, también le encontramos problemas a la LDH para su utilización como marcador de daño muscular esquelético. Siendo su principal inconveniente su amplia distribución tisular que hace que sea un indicador inespecífico (Bigard, 2001; Wu *et al.*, 2004). Pudiéndose encontrar niveles elevados de esta enzima en el infarto de miocardio, enfermedades hepáticas, hemólisis, y algunas enfermedades malignas (especialmente en el linfoma no-Hodgkin), enfermedades musculares y muchas otras condiciones que implican lesiones tisulares. La hemólisis durante la extracción de la sangre o su manipulación puede producir un resultado elevado por un artefacto de laboratorio (McComb, 1983).

Así pues, diferentes autores nos indican que niveles altos de LDH en deportistas entrenados, pueden indicarnos posiblemente daño crónico del hígado ya que este trabaja a gran ritmo durante la práctica deportiva (Yao *et al.*, 2003)

En cuanto a las Troponinas hemos observado diferencias significativas en los niveles de TnT entre los sujetos sanos y con daño muscular, y entre el grupo de daño muscular y entre el grupo de deportistas de élite, pero aunque

realmente vemos diferencias significativas entre los dos pares de grupos, no podemos considerar dichos niveles encontrados de proteína en suero, como algo significativo, ya que son unos niveles muy bajos (0,00731 ng/mL) y que según la bibliografía no son considerados como daño muscular. Así, en trabajos realizados el nivel sérico superior de TnT en voluntarios sanos donantes de sangre resultó de 0,06 ng/mL (Gerhardt *et al.*, 1992). En dos estudios más recientes, la concentración plasmática media de TnT en personas sanas resultó de 0,001 ng/mL (rango 0,00 a 0,02 ng/mL) (Luscher *et al.*, 1997) y de  $0,0002 \pm 0,001$  ng/mL (Missov *et al.*, 1999), respectivamente. Por lo tanto en nuestros resultados si nos guiamos por los valores obtenidos en los niveles de TnT no observaríamos daño muscular en ningún grupo de estudio. También tenemos que destacar la inespecificidad de la TnT como marcador de daño muscular ya que nos detecta las dos isoformas la cardiaca y la esquelética.

Mientras que en la cTnI las diferencias entre los diferentes grupos fueron mínimas no siendo significativas entre los grupos daño muscular y grupo control. Según Sorichter esto se debe a la cardioespecificidad de la cTnI como marcador, permitiendo así distinguir entre lesiones cardíacas y lesiones esqueléticas, de esta forma este marcador nos permite así descartar el posible daño muscular cardiaco que nos pueda interferir en los resultados. Estos datos han sido confirmados mediante diferentes investigaciones indicando la especificidad de dicho marcador para daño cardiaco, no siendo útil así dicha isoforma (c) como marcador músculo esquelético (Cummins *et al.*, 1987; Larue *et al.*, 1993). En este marcador también cabe destacar los bajos niveles encontrados en el suero de todos los sujetos analizados, siendo esto muy importante y significativo ya que de esta forma descartamos la posible interferencia del daño cardiaco a la hora de detectar el daño músculo esquelético. Aún así, encontramos diferencias significativas entre los grupos de daño muscular y el de deportistas de élite, pero no podemos considerar dicha significatividad como importante ya que los niveles medios de TnI detectados en los dos grupos son insignificantes (entre 0,03 y 0,017 ng/mL). Ya que los valores de referencia para el diagnóstico de daño cardiaco se sitúan en cifras de 3,1 a 19  $\mu\text{g/L}$ , con sensibilidad de 90 a 100 % y especificidad de 93 a 100 % (Benoit *et al.*, 2001; Ordóñez *et al.*, 1995). Los valores de troponina I  $> 40$

ng/mL se asocian a anormalidades de motilidad de la pared ventricular y aparición de Q en el ECG. Valores > 60 ng/mL tienen fuerte asociación a eventos isquémicos cardíacos, arritmias, tiempo de ventilación y estadía (Benoit et al., 2001).

Por otra parte hemos observado una gran diferencia entre los niveles de  $\alpha$ -actina en suero entre el grupo control y el grupo con daño muscular esquelético. Según Féasson (Féasson *et al.*, 2002) el ejercicio no es un inductor de variaciones en los niveles de  $\alpha$ -actina. Por lo tanto nuestros resultados obtenidos en estos grupos sugieren que en pacientes con daño muscular esquelético, la presencia de la  $\alpha$ -actina circulante en el torrente sanguíneo, puede ser reflejo de un proceso de lesión celular. Al igual que existen diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre los grupos de deportistas lesionados y deportistas sanos. Pudiéndose observar como las cantidades detectadas en suero son mucho mayores que el de resto de proteínas analizadas y utilizadas. Estando los niveles medios de actina en sujetos con daño muscular en 37,48  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , existiendo grandes diferencias con respecto a los niveles detectados de los demás marcadores.

Al no encontrar un anticuerpo específico que nos detectara solo la isoforma músculo esquelético nos vimos obligados a utilizar la TnI para descartar ese posible daño cardíaco. El que no exista un anticuerpo específico para detectar dicha isoforma esquelética se debe principalmente a que la homología de secuencia proteica entre las dos alfa actina es del 98,9% y únicamente se diferencian en dos aminoácidos. Por ello, los anticuerpos frente alfa actina sarcomérica no pueden distinguir entre músculo cardíaco y esquelético. Sí pueden discriminar músculo liso.

### ➤ **Estudio 2. Modificaciones de los marcadores proteicos en las diferentes disciplinas o modalidades deportivas**

Esta altamente comprobado que la práctica deportiva produce liberación de proteínas intracelulares (Gleeson *et al.*, 2003; Julián *et al.*, 2004) y se cree que esto es debido a cambios en la permeabilidad o a rotura de la membrana

muscular (Komulainen *et al.*, 1994). Todo esto nos llevó a estudiar los diferentes marcadores, utilizados en nuestro estudio, en diferentes disciplinas deportivas y ver su variabilidad.

En este segundo estudio se analizó la mioglobina (Mb) en los diferentes grupos (deporte balonmano, deporte rugby y deporte individual) para ver las diferencias existentes en los niveles de dicha proteína. Buscando significatividad de dicha variable en la comparación entre los grupo, ya que de este modo compararemos la variabilidad de dicha proteína según la práctica deportiva realizada por los sujetos.

Podemos observar que en los niveles de mioglobina no se encuentra diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre ninguno de los grupos analizados. Manteniéndose unos niveles constantes dentro de cada grupo de estudio, estando la media de mioglobina en los grupos entre 45,54 y 34,23 ng/mL. Estos niveles de mioglobina obtenidos estarán dentro del rango normal, que es de 0 a 85 ng/ml (Sayers *et al.*, 2000). Estos resultados obtenidos tenemos que tener en cuenta que las tomas realizadas a los deportistas son aisladas y en estado de reposo.

Por el contrario, los resultados en los niveles de actividad de CK reflejan diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre los grupo de balomno y rugby, siendo los niveles de CK mas altos en el grupo de balonmano (342,5 y 235,4 UI/L respectivamente). Como nos indican Balnave y Hortobagyi, esto se puede deber a diferentes factores, tales como la disciplina deportiva que practique (rugby o balonmano) el entrenamiento diario que lleve el deportistas (Balnave *et al.*, 1993; Hortobagyi *et al.*, 1989). Así pues, en nuestros resultados podemos reproducir lo dicho en estos trabajos, ya que comprobamos que el nivel de entrenamiento exigido al grupo de deportistas de balonmano era más alto que el de jugadores de rugby. Siendo el grupo de deportistas de balonmano deportistas de dedicación más profesional que el grupo de deportistas de rugby. Según Mashiko, esto sugiere una acumulación posible de la fatiga debido al ejercicio intenso diario, que puede inducir lesión del músculo y degradación de las proteínas somáticas del tejido fino (Mashiko *et al.*, 2004).

En cambio observamos como el grupo de deportistas de practica individual (atletas, piraguitas,..) los niveles detectados de CK son más bajos, siendo estos valores acordes al estudio realizado por Takarada, donde nos dice que en los deportes de impacto cuerpo a cuerpo, como el rugby, presentan niveles mas altos de CK (Takarada, 2003).

Los niveles de LDH en relación a las disciplinas deportivas, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) del grupo de deportes individuales con respecto a los dos grupos de rugby y balonmano. Esto se puede deber según Van Der Meulen en 1991, al aumento de los niveles enzimaticos después de un actividad de larga duración, siendo este el caso del grupo de deportistas inviduales, siendo todos deportistas de larga distancia. Diferentes estudios comprobaron esto en deportistas de maraton, en los que en los 12 últimos km. de una maratón, el daño muscular aumenta desproporcionadamente en comparación con el daño producido en los primeros 30km. (Janssen *et al.*, 1989). Aunque con menos evidencia, existen otras variables que influyen en la liberación de estos enzimas musculares, como son la raza (Friden *et al.*, 1984), la edad (Gale *et al.*, 1979; Nosaka *et al.*, 1991), la masa muscular (Manfredi *et al.*, 1991; Novak *et al.*, 1977) y la ingesta de proteínas (Hayward *et al.*, 1999).

En los niveles de cTnT, aún existiendo diferencias significativas entre dos pares de grupo (Individuales-Rugby e Individuales-Balonmano), no podemos decir que estos niveles reflejen un posible daño muscular ni una posible disrupción intra y/o extracelular de las membranas que permite la hidrólisis de proteínas estructurales. Estando los niveles medios de TnT de los diferentes grupo entre 0,0028 y 0,016 ng/mL. Pero como vemos en el estudio realizado por Gerhardt, el nivel sérico superior de TnT en voluntarios sanos donantes de sangre resultó de 0,06 ng/mL (Gerhardt *et al.*, 1992).

En la variable TnI analizada en los diferentes grupos observamos que no existen diferencias significativas una vez analizados los datos estadísticamente, estos resultados son los esperados ya que así estamos

descartando el posible daño cardíaco que pueda sufrir los deportistas y que nos pueda inferir en los resultados finales.

La justificación en la utilización de este marcador (TnI) para descartar el posible daño cardíaco, que nos influya negativamente en los resultados, es que en la actualidad, el marcador de daño cardíaco al que más valor se le está concediendo es al complejo de las Troponinas, en especial a las isoformas cardíacas de la Troponina T e I (cTnT y cTnI) (Wu *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 2000; Van de Werf *et al.*, 2003). Numerosos inmunoensayos automatizados con diferentes anticuerpos monoclonales se están comercializando. De acuerdo con los datos publicados, se considera que ambas Troponinas tienen la misma sensibilidad y especificidad para la detección de daño miocárdico y para dar información pronóstica en el Síndrome Coronario Agudo (SCA) (Olatidoye *et al.*, 1998; Collinson, 1998; Ottani *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 2002). En el caso de no disponer de las Troponinas la mejor alternativa es la CK-MB masa, que aunque presenta menor especificidad tiene demostrada su validez. El resto de marcadores como la CK total, LDH, GOT (AST), etc. no son recomendados (Alpert *et al.*, 2000). En los casos en los que la precocidad en el resultado sea determinante se recomienda usar marcadores de aparición precoz como la CK-MB y la Mioglobina que se verán confirmados posteriormente con la elevación de un marcador más específico (Troponinas).

Los valores medios obtenidos de  $\alpha$ -actina, en el grupo de jugadores de balonmano, fueron mas altos que el del resto de grupos existiendo diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) de este grupo con los dos restantes grupos (Rugby y Dep. Individuales). Como hemos comentado anteriormente, estos niveles altos de liberación proteica detectados en el suero de los deportistas se pueden deber a diferentes variables que influyen, como pueden ser la raza (Friden *et al.*, 1984), la edad (Gale *et al.*, 1979; Nosaka *et al.*, 1991), la masa muscular (Manfredi *et al.*, 1991; Novak *et al.*, 1977), la ingesta de proteínas (Hayward *et al.*, 1999) y el estadio de entrenamiento e intensidad de entrenamiento donde se encuentre el grupo de deportistas, ya que si se encuentra en una etapa de carga en el entrenamiento el desgaste muscular es mayor y observandose que tras el ejercicio físico continuado se produce un edema muscular, el cual

contribuye al daño de la célula muscular (Komulainen *et al.*, 1993; Peeze *et al.*, 1990) probablemente por el aumento del volumen celular y como resultado de ello, estiramiento y posterior ruptura de la membrana celular (Komulainen *et al.*, 1994)

➤ **Estudio 3. Modificaciones de los marcadores proteicos en un partido de alta competición.**

La liberación de enzimas musculares en deportistas se usa para estimar la cantidad de daño muscular después de hacer ejercicio, basándose en la suposición de que la liberación de enzimas musculares se relaciona con la cantidad de enzimas musculares así como la cantidad de daño muscular provocado por el ejercicio (Appley *et al.*, 1988; Friden *et al.*, 1983; Janssen *et al.*, 1989).

Por su parte, Armstrong en 1983 demostró que ratas no entrenadas sometidas a ejercicio físico agotador liberaban más enzimas musculares que las entrenadas. La liberación de estas proteínas intracelulares se cree que es debida a cambios en la permeabilidad o a rotura de la membrana muscular (Komulainen *et al.*, 1994).

Algunos autores no encuentran correlación entre la liberación de enzimas musculares y el daño muscular analizado histológicamente (Van Der Meulen *et al.*, 1991), lo cual apoya el hecho de que el aumento en la liberación de enzimas sea permitido por el aumento de la permeabilidad de la membrana. El mecanismo no se conoce con seguridad, y aunque fuera por el aumento de la permeabilidad de la membrana, no se conoce cual es el mecanismo por el que ésta aumenta.

Las actividades aerobias de larga duración, como el maratón, es frecuente observar un aumento en el plasma sanguíneo de la creatina fosfoquinasa y de la mioglobina, como expresión del daño muscular, lo que ha llevado a ciertos autores a considerar a tales elevaciones, como un signo de sobreentrenamiento en este tipo de ejercicios (Koutedakis *et al.*, 1993). Sin

embargo, hechos similares se pueden observar tras la realización de ejercicios agudos, y al finalizar el entrenamiento y la competición, en atletas que no sufren el síndrome de sobreentrenamiento (Rogers *et al.*, 1985).

En este tercer estudio nuestro objetivo fue ver la liberación proteica que se producía tras la práctica de una actividad intensa, en nuestro caso fue un partido de alta competición. Teniendo como referencia, a la hora de ver la liberación proteica que se producía tras el esfuerzo, los valores en reposo tomados antes de realizar la actividad física.

Observamos como los niveles de mioglobina tras el partido de alta competición aumentaba a gran escala tanto en el grupo de balonmano como en el de rugby, siendo los resultados significativos en ambos grupos. Produciéndose un aumento mayor de mioglobina tras el partido en el grupo de rugby que en el de balonmano. Como nos dice Takarada en un trabajo publicado en el 2003, esto se puede deber a que un partido competitivo de rugby implica generalmente agresión física y juego más poderosos entrando continuamente en contacto el cuerpo (Takarada *et al.*, 2003). Existiendo además diferentes posiciones de juego donde unos jugadores van a sufrir mayor contacto cuerpo a cuerpo que otros, esto se puede ver reflejado en los resultados intrasujetos, como la variabilidad de la mioglobina entre los sujetos es muy importante.

Sin embargo dicho parámetro varía considerablemente de unos individuos a otros, por lo que no se pueden obtener conclusiones válidas para el diagnóstico precoz de la fatiga y el daño muscular, además esta proteína es considerada por varios autores como una proteína muy inespecífica, ya que se encuentra a nivel esquelético y cardíaco, y que se libera muy tempranamente a la sangre (Mair, 1999). Debido a esta liberación tan precoz encontramos estos niveles tan altos en el suero de los deportistas tras el partido. También se debe destacar que en estudios anteriores, encontramos relación con lo obtenido, y es que la mioglobina aparece muchos antes en sangre que la CK y por lo tanto alcanza su pico más pronto (Mair *et al.*, 1999; Rodenburg *et al.*, 1993).

El indicador bioquímico más utilizado, hoy día, para valorar el daño muscular es la medición de la liberación al plasma de la enzima intramuscular Creatina Kinasa (CK). El tiempo en que se produce la elevación de la actividad CK en plasma tras la realización de un ejercicio agudo varía según los autores, variando desde algunos que muestran el pico inmediatamente tras el ejercicio (Amelink *et al.*, 1986, Amelink *et al.*, 1988, Hayward *et al.*, 1999, Van Der Meulen *et al.*, 1991), mientras que otros que llevan a cabo carrera en pendiente hacia abajo llegan a encontrar dos picos, uno a las 0 horas y otro a las 24-36 horas (Armstrong *et al.*, 1983, Newham *et al.*, 1983, Schwane *et al.*, 1983). En concreto, Van der Meulen destaca la tremenda diferencia que encuentran entre los niveles de actividad CK tras ejercitar ratas durante 1,5 horas y los niveles de CK tras ejercitar ratas durante 2,5 horas (Van Der Meulen *et al.*, 1991) lo cual se ha comprobado también en humanos.

Diferentes estudios nos afirman que tras la práctica de ejercicio de alta intensidad, las proteínas del músculo tales como kinase de la creatina (CK) y el myoglobin (Mb) se lanzan del músculo dañado y aparecen en la sangre (Clarkson *et al.*, 2002). En nuestro estudio comprobamos como después de la práctica de un ejercicio de alta intensidad los niveles de CK varían significativamente con respecto a la primera toma realizada antes del partido. Llegando los niveles de CK después del partido a 409,6 UI/L en jugadores de balonmano y de 391,1 UI/L en los de rugby. Hay que destacar que ya los dos grupos estudiados parten con unos niveles altos de CK en sangre, de 308,6 los de balonmano y de 235,4 los de rugby. Pero los niveles obtenidos de CK aumentaron perceptiblemente después del partido. Esto sugiere una acumulación posible de la fatiga debido al ejercicio intenso diario, que puede inducir lesión del músculo y degradación de las proteínas somáticas del tejido fino a través del período del partido.

Según diferentes autores la liberación de estas enzimas estas enzimas inducen la inflamación muscular y derrumbamiento del músculo esquelético, o aumentan la permeabilidad de la membrana celular del músculo, según estos autores estas enzimas pueden proporcionar un marcador útil de daño músculo esquelético e indicar la severidad de la fatiga muscular inducida por

exercise (Koutedakis *et al.*, Olerud *et al.*, 1976), estas enzimas aumentan más en sujetos no entrenado que en entrenados habitualmente durante un ejercicio intenso (Evans *et al.*, 1986). Sucediendo esto en nuestro estudio en los niveles de LDH y Mioglobiina, como los sujetos mas entrenados regularmente (Balonmano), los niveles de dichos parámetros se elevaban menos que los del otro grupo ya que sus músculos, debido al entrenamiento deben tener cierta protección contra daño del músculo (Evans *et al.*, 1986).

Según Nosaka, el problema más grande que ve en usar cualquier proteína del músculo en la sangre como marcador de daño muscular, es la variabilidad tan grande que se produce entre los sujetos en la liberación, con una gama de 236 a 25.244 IU/L citada en su estudio (Nosaka *et al.*, 1996). Generalmente, esos individuos con la actividad más alta de CK en la sangre tienen un daño muscular mas grande determinado por MRI, pero esto no es una relación perfecta.

Aunque también observamos que la variabilidad tan grande en respuesta de CK al ejercicio no se entiende y no parece ser relacionada con el sexo, la masa muscular, o el nivel de actividad de los deportistas. Un estudio reciente demostró que la actividad de CK en suero fue relacionada con la actividad del glutathione en suero, y los autores sugirieron que el glutathione sirviera como protector de la CK durante el curso de vida de la enzima en la circulación (Gunst *et al.*, 1998). Esto y otros factores podrían explicar en última instancia la variabilidad grande en la respuesta de CK al ejercicio. Sin embargo, está claro que la actividad de la sangre CK proporciona solamente un marcador cualitativo indirecto de daño muscular y se puede influenciar por varios factores con excepción de daño, incluyendo factores genéticos posibles (Clarkson *et al.*, 2002)

En este estudio se pudo observar el perfil de la actividad LDH en plasma tras llevar a cabo ejercicio físico agudo. Nuestros resultados, que manifiestan en el grupo de jugadores de rugby un aumento, tras el partido de alta competición, de dicha actividad del 95 % son similares a los presentados por Komulainen en 1994, los cuales muestran un incremento del 85 %

aproximadamente (Komulainen et al., 1994). El comportamiento de la actividad LDH en nuestro estudio muestra diferente comportamiento en el grupo de balonmano, observando en estos últimos unos niveles mayores pero no existiendo diferencias grandes entre antes y después del partido sino que se produce una subida muy tímida de los niveles.

En este estudio como en el resto, los niveles de troponinas (TnI y TnT) son muy bajos no existiendo diferencias significativas en los niveles de TnI después de realizar el ejercicio intenso. Siendo esto positivo para discriminar el posible daño cardíaco y no influir así en la detección del posible daño muscular esquelético producido por el ejercicio. Del mismo modo actúa la TnT, detectándose cantidades mínimas de dicha proteína y por lo tanto no considerándose significativa dichos niveles encontrados en el plasma de los deportistas tras el esfuerzo. Por lo tanto, cuando no existen enfermedades concomitantes (Missov *et al.*, 1999), los niveles séricos de TnTc son muy bajos y aun indetectables. Considerándose los niveles encontrados en nuestro estudio valores que están dentro de la normalidad, tal y como nos indican los estudios de Missov, que nos dice que los valores máximos normales de TnT para sujetos sanos son de 0,06 ng/mL, encontrando nosotros valores máximos de 0,03 ng/mL.

Con respecto a la variación de los niveles de  $\alpha$ -actina tras el ejercicio intenso (partido de competición) encontrados en el suero, muestra el mismo comportamiento en el grupo de balonmano que en el de rugby. Produciéndose un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en los dos grupos tras la práctica de ejercicio intenso. Pasando los niveles de actina en el grupo de balonmano de 7,16 a 26,47  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y en el equipo de rugby de 1,24 a 20,04  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Sorprendentemente Féasson nos dice todo lo contrario (Féasson *et al.*, 2002). Afirmandonos con su estudio, que los efectos del ejercicio excéntrico en la  $\alpha$  actina: a la vista de los efectos del ejercicio en la estructura muscular, intentó identificar si la expresión de los componentes de la red miofibrilar podrían ser alterados en respuesta a un estrés mecánico. Para ello determinó el nivel de  $\alpha$  actina por análisis con inmunoblotting, inmediatamente después,

un día después y en el día 14 después de un ejercicio excéntrico, permaneciendo los niveles de alfa actina sin cambio. Dicho estudio nos afirma que el nivel de alfa actina permanece inalterable en respuesta al ejercicio, ilustrando que señales moleculares disparadas por ejercicio excéntrico regulan de manera diferente la expresión de proteínas musculares.

Este trabajo nos puso en duda los resultados obtenidos en estudio previos, pero la ejecución de varios estudios nos confirmó nuestra hipótesis, produciéndose los mismos efectos de liberación de dicha proteína en todos los estudios realizados. Por lo tanto podemos decir que la proteína alfa actina sufre cambios amplios inmediatamente después de la práctica de ejercicio intenso.

➤ **Estudio 4. Evolución temporal y modificaciones de los marcadores proteicos en un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante.**

Finalmente con este estudio quisimos comprobar como los parámetros analizados hasta el momento evolucionaban a lo largo del tiempo y tras la realización de un ejercicio intenso controlado (test de esfuerzo). Este estudio era necesario para comprobar la fiabilidad de la actina como marcador de daño muscular esquelético y para ver como evolucionaba a lo largo del tiempo dicha proteína tras la práctica de ejercicio.

Con respecto a los marcadores utilizados cabe destacar que fueron significativos sólo tres (mioglobina, actina y CK) del total utilizados. A continuación nos centraremos en el análisis de los tres marcadores que resultaron significativos en la realización de este estudio. No encontrándose significatividad en los resultados obtenidos de las troponinas (TnI y TnT) y la LDH. No encontrándose variabilidad en los niveles de estas proteínas en las diferentes tomas realizadas después del ejercicio intenso.

Los niveles de CK observamos como el pico más alto de CK lo encontramos justo al terminar el test de esfuerzo (437,3 UI/L), produciéndose un pequeño descenso a la hora de la finalización de dicho test (424 UI/L) y finalmente a las 24 horas vemos como vuelve a los niveles de los que

partiamos antes de realizar dicho test (360,4 UI/L). Ante estos resultados nos planteamos cual es el tiempo en que se produce la elevación de la actividad CK en plasma tras la realización de un ejercicio agudo, esto va variar según los autores, variando desde algunos que muestran el pico inmediatamente tras el ejercicio (Amelink *et al.*, 1986; Amelink *et al.*, 1988; Hayward *et al.*, 1999; Van Der Meulen *et al.*, 1991), con los cuales coincidimos con nuestros resultados obtenidos en los niveles de CK; mientras que otros que llevan a cabo carrera en pendiente hacia abajo llegan a encontrar dos picos, uno a las 0 horas y otro a las 24-36 horas (Armstrong *et al.*, 1983; Newham *et al.*, 1983; Schwane *et al.*, 1983).

Todos estos resultados lanzan una duda sobre la especificidad y la sensibilidad de la actividad plasmática del CK. Bien se sabe que es muy ampliamente utilizada, la medida de la actividad de las enzimas sarcoplasmiques en el plasma como el CK o el LDH representa un mal factor pronóstico de la gravedad de las lesiones musculares inducidas por el ejercicio y del estado de decaimiento celular. No existe estrecha correlación entre lesiones musculares histológicamente visibles y liberación de las enzimas sarcoplasmaticos (Bigard *et al.*, 2001)

Según Sorichter la liberación de CK en el plasma no está vinculada a la severidad del ejercicio y a los dolores tisulares, sino que en realidad es un marcador de baja especificidad y sensibilidad (Sorichter *et al.*, 1997). Ante esto la utilización conjunta de los distintos parámetros biológicos y clínicos que debería sin embargo permitir apoyar el diagnóstico, como, por ejemplo, la asociación a un aumento de la actividad del LDH en el plasma, de la mioglobina, el MDA, el número de leucocitos y la alteración de los resultados musculares (Kayashima S., *et al.*, 1995).

El nivel de mioglobina en el suero de los deportistas, alcanza su pico más alto a la hora de haber finalizado el test de esfuerzo (83,2 ng/mL), descendiendo sus niveles a las 24 horas de la finalización (78,6 ng/mL). Como podemos ver la mioglobina ofrece su característico perfil descendente como consecuencia de su rápido aclaramiento renal (Santaló *et al.*, 2003). A pesar de

ello, sus respectivos valores de concentración en el tiempo son superiores a la toma realizada como control antes de realizar el test.

Diferentes autores confirma que la mioglobina se libera antes a la sangre y que alcanza su pico más alto antes que la enzima CK (Mair *et al.*, 1999; Rodenburg *et al.*, 1994). Coincidiendo con nuestros resultados están estos autores, ya que en nuestro estudio el pico más alto se encontró a la hora de finalización del test. Cabe destacar como los niveles medios de mioglobina son todos normales o bajos.

Como lo precisamos más arriba, la falta de sensibilidad y reproductividad de la actividad enzimática conduce a considerar con mucha prudencia las variaciones de estos parámetros biológicos. No es posible evaluar el alcance de las lesiones musculares inducidas por el ejercicio sobre la base de las variaciones de estos parámetros. Por otra parte, estos parámetros no son específicos de las microlesiones musculares vinculados a la práctica intensa del ejercicio y la actividad enzimática plasmática puede también aumentar después de contusiones musculares directas o traumatismos. Así pues, si la ruptura del sarcolema y el decaimiento muscular se acompañan bien de un aumento de la actividad enzimática y proteica (LDH, CK y mioglobina), al contrario no es verdadero; el aumento de la actividad enzimática puede limitarse a reflejar una escasa permeabilidad membranaria vinculada a la tensión oxidativa seguida de procesos de reparación que permitan una perfecta cicatrización sin secuelas.

Los niveles máximos de detección de actina están justo al terminar el ejercicio (test de esfuerzo), siendo los niveles de actina liberados casi el doble de los detectados antes del ejercicio. Después podemos observar como van descendiendo los valores levemente una vez que transcurre la primera hora. Las medias de liberación de actina encontradas después del esfuerzo físico fueron de 15,3  $\mu\text{gr/ml}$  partiendo de unos niveles de 8,2  $\mu\text{gr/ml}$ .

Observamos como los niveles de actina las 24 horas desciende llegando a los niveles de partida por lo que se concluye que la valoración de los niveles

séricos de actina tras un deporte intenso pierden interés conforme transcurre el tiempo desde que se realiza y que al cabo de 24 horas no se detectan cambios respecto a los niveles de partida. Estos resultados contrastan con respecto a lo obtenido por Feason en el 2002, donde no observa cambios ni variabilidad en los niveles de alfa actina después de un ejercicio intenso. Concluyendo dicho estudio, donde los niveles de actina permanecen inalterables en respuesta al ejercicio.

Revisando la bibliografía existente llegamos a la conclusión de que no existen marcadores fieles, sensibles y reproducibles de las lesiones de las fibras musculares inducidas por el ejercicio exhaustivo. Así pues, el diagnóstico de gravedad de estas lesiones y la estimación de su amplitud plantean siempre grandes problemas en la práctica diaria. A la pregunta que nos hacemos de que si el aumento de los marcadores de lesiones musculares se asocia a un estado de entrenamiento máximo, se puede responder con una negación. Sin embargo, las fibras dañadas son el origen de la liberación de citoquinas pro inflamatorias que tienen consecuencias sobre el desarrollo de señales clínicas que pueden integrarse al cuadro clásico de entrenamiento máximo. La realización de ejercicios repetidos intensos y, sin período de recuperación suficiente representa también una situación de riesgo de desarrollo y evolución del daño muscular (Bigard *et al.*, 2000). Algunas de las consecuencias de estos ejercicios sobre el músculo, pueden contribuir a constituir señales clínicas a menudo integradas en el cuadro del daño muscular.

Debido a todos estos problemas en la utilización de un marcador de daño muscular fiable llegamos a la conclusión de que el marcador ideal debe de ser músculo específico, su concentración intracelular alta, liberarse con rapidez en caso de lesión, mantener su concentración elevada durante un tiempo suficiente en la sangre y ser estable. En el suero de personas sanas este marcador debería ser indetectable o bien encontrarse en una concentración muy baja que se diferencie claramente de su presencia al producirse daño en el órgano. Debería tener una elevada sensibilidad diagnóstica, especialmente en las primeras horas de la lesión y, finalmente,

poseer una especificidad diagnóstica tan próxima al 100% como sea posible (Adams *et al.*, 1994).

El hecho de que la  $\alpha$ -actina es la molécula mayoritaria del compartimento celular citosólico pudiendo ser detectada hasta 72 h después de su liberación (Korn *et al.*, 1982; Korn *et al.*, 1987), supone una ventaja en comparación con la troponina ya que de cada siete monómeros de Actina existe una molécula de Troponina (Katus *et al.*, 1992) y con una liberación al torrente sanguíneo más tardía que la  $\alpha$ -actina que se detecta desde la primera hora del inicio de los síntomas (Aránega *et al.*, 1993).

Por lo tanto estimamos que la actina es un candidato ideal para responder a las carencias diagnósticas que poseen otros marcadores y consideramos que evaluar sus resultados comparativamente en las mismas muestras con otros marcadores actualmente en uso podría reportarnos información muy interesante y todavía inédita acerca de su utilidad en el terreno del rendimiento deportivo.

En este estudio comprobamos que la alfa actina reúne potencialmente unas características que la pueden convertir en un nuevo y más eficaz marcador bioquímico de daño músculo-esquelético.

En resumen, nuestro estudio revela que la alfa actina es un buen marcador molecular para ser utilizado en el estudio y diagnóstico del daño muscular esquelético. Sus características de precocidad y la capacidad de detectarse en el suero de deportistas le confieren unas características que no poseen ninguno de los marcadores comercializados actualmente. Esta circunstancia, nos lleva a sugerir la conveniencia de iniciar trabajos encaminados a desarrollar un ensayo optimizado de alfa actina en suero o plasma de pacientes con daño muscular esquelético y que pueda ser susceptible de automatizarse en un equipo autoanalizador de forma rápida y precisa. La alfa actina permitirá profundizar más en la patología del daño muscular y aportará una herramienta más sensible al diagnóstico permitiendo

detectar daño muscular en deportistas en situación de riesgo de lesión, suponiendo esto un avance a la hora de controlar los riesgos de lesión relacionados con el entrenamiento llevado a cabo por el deportista.

Con los resultados obtenidos en este estudio no podríamos generalizar en todas las disciplinas deportivas, sino que en futuras líneas de investigación no debemos plantear el determinar los niveles de liberación de alfa actina exactos que se encuentra en el deportista cuando hay sobre carga muscular y cuando hay daño muscular, determinando así unos valores exactos que nos permita distinguir, dicha liberación de proteína en el torrente sanguíneo, entre sobre carga muscular, daño muscular producido tras un esfuerzo máximo y lesión muscular.



## **VII. CONCLUSIONES**

- Los marcadores de daño muscular mioglobina, creatin kinasa, lactodeshidrogenasa, troponina T y  $\alpha$ -actina se liberan a suero en gran cantidad en pacientes politraumatizados, en comparación con sujetos sanos y deportistas.
- Los niveles de troponina no se modificaron en ninguno de los diferentes grupos de estudio.
- El western blot es un método sensible y específico para la detección de  $\alpha$ -actina en suero circulante.
- La alfa actina se encuentra elevada significativamente en el suero de los sujetos con daño muscular esquelético siendo un marcador molecular útil para su estudio y diagnóstico.
- La alfa actina no presenta interferencias cruzadas con los pacientes que presenten un posible daño cardíaco.
- La alfa-actina se libera a sangre periférica justo después de un esfuerzo físico intenso.
- La alfa actina se eleva precozmente respecto a los otros marcadores específicos comparados en el estudio, pudiéndose utilizarse como marcador proteico de daño muscular en deportistas.





## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. (1993) Biochemical markers of myocardial injury: is MB creatin kinase the choice for the 1990s? *Circulation*, 88:750-763.

Adams, JE. (1994) Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme y cardiac troponin I. *Clin Chem.*, 40: 1291.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1986) El Citoesqueleto. *Biología Molecular de la Célula*, 587-654.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1989) Molecular biology of the cell. *New York. Garland Publishing, Inc.* 1322. pp. 7-15.

Aldestein RS, Einsenberg E. (1980) Regulation and Kinetics of the actin-myosin-ATP interacción. *Annu. Rev Biochem.*, 49: 921-956.

Alonso S. (1987) Coexpression and evolution of the two sarcomeric actin genes in vertebrates. *Biochimie*, 69: 1119-1125.

Allen RE, Rankin LL (1990). Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 194: 81-86.

Apple FS, Rhodes M. (1988) Enzymatic estimation of skeletal muscle damage by analysis of changes in serum creatine kinase. *J. Appl. Physiol.*, 65:2598-600.

Aránega AE, Velez C, Prados J, Melguizo C, Marchal JA, Arana N, Alvarez L, Aranega A. (1990) Modulation of  $\alpha$ -actin and  $\alpha$ -actinin proteins in cardiomyocytes by retinoic acid during development. *Cell Tissues Organs.*, 164: 82-89.

Aránega A, González FJ, Aránega AE, Muros MA, Fernández J, Vélez C, Prados J, Alvarez L. (1991) Effects of fibric acid derivatives on accumulation of actin in myocardiocytes. *Int J Cardiol.*, 33: 47-54.

Aránega AE. (1991) Determinación por Western Blott de alfa actina en Isquemia Cardíaca. Tesis Doctoral Universidad de Granada.

Aránega AE, Reina A, Velez C, Alvarez L, Melguizo C, Aránega A. (1992) Circulating alpha-actin in angina pectoris. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 24: 15-22.

Aránega AE, Reina A, Velez C, Alvarez L, Melguizo C, Aránega A. (1993) Circulating  $\alpha$ -Actin in Angina Pectoris. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29:15-22.

Aránega AE, Reina A, Muros MA, Alvarez L, Prados J, Aránega A. (1993) Circulating alpha-actin protein in acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiology*, 38: 49-55.

Aranega AE, Velez C, Prados J, Melguizo C, Marchal JA, Arena N, Alvarez L, Aranega A. (1999) Modulation of alpha actin and alpha actinin proteins in cardiomyocytes by retinoic acid during development. *Cell Tissues Organs*, 164: 82-89.

Armstrong RB. (1984) Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.*, 16 : 529-538.

Armstrong RB, Warren GL, Warren JA. (1991) Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med.*, 12: 184-207.

Asp S, Daugaard JR, Kristiansen S, Kiens B, Richter EA. (1996) Eccentric exercise decreases maximal insulin action in humans: muscle and systemic effects. *The Journal of Physiology*, 494, 891-898.

Atalay M, Marnila P, Lilius EM, Hanninen O, Sen CK. (1996) Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function in rats. *Eur J Appl Physiol.*, 74 : 342-357.

Balnavé CD, Thompson MW. (1993) Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Appl. Physiol.*, 75: 1545-1551.

Baumann BA, Liang H, Sale K, Hambly BD, Fajer PG. (2004) Myosin regulatory domain orientation in skeletal muscle fibers: application of novel electron paramagnetic resonance spectral decomposition and molecular modeling methods. *Biophys J.*, 86(5):3030-3041.

Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. (1998) Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol. Cell. Biochemistry*, 179 : 135-145.

Bessman SP, Geiger PJ. (1981) Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science*, 211: 448-452.

Bigard AX, Merino D, Lienhard F, Serrurier B, Guezennec CY. (1997) Muscle damage induced by running training during recovery from hindlimb suspension: the effect of dantrolene sodium. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 76 : 421-437.

Bigard AX. (2001) Exercise-induced muscle injury and overtraining. *Science & Sports*, 16: 204-215.

Benoit MO, Paris M, Sillera J, Fiemeyer A, Moati N. (2001) Cardiac Troponin I: its contribution to the diagnosis of perioperative myocardial infarction and various complications of cardiac surgery. *Crit. Care. Med.*, 29:1880-1886.

Bodor GS. (1997) Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation*, 96 (5):1495-500.

Bonetti A, Tirelli F, Albertini R, Monica C, Monica M, Tredici G. (1996) Serum cardiac troponin T after repeated endurance exercise events. *Int. J. Sports Med.*, 17 : 259-262.

Bravo R, Fey SJ, Larsen PM, Celis JE. (1981) Coexistence of three major isoforms of actin in a single sarcoma 180 cell. *Cell*, 25:195-202.

Brandt RB, Laux JE, Spainhour SE, Kline ES. (1987). Lactate dehydrogenase in rat mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 259: 412-422.

Brooke MH, Kaiser KK. (1970) Muscle fiber types: How many and Chat kina? *Archives of Neurology*, 23: 369-379.

Brooks GA, Dubouchaud H, Brow M, Sicurello JP, Butz E. (1999) Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96: 1129-1134.

Buchthal F, Schmalbruch H. (1970) Contraction times and fiber types in intact muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 79: 435-452.

Canalias F. (2000) Isoformas cardíacas de la Troponina. Educación continuada en el laboratorio clínico. *SEQC 4*, 1-7.

Carlier MF. (1987) Measurement of Pi dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 143 (3): 1069-1075.

Carlson BM, Faulkner JA. (1983) The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 15: 187-198.

Carraro U, Franceschi C. (1997) Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise. *Aging. Clin. Exp. Res.*, 9: 19-34.

Carroll CC, Carrithers JA, Trappe TA. (2004) Contractile protein concentrations in human single muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 25(1):55-69.

Chang KS, Rothblum KN, Schwartz RJ. (1985) The complete sequence of the chicken alpha-cardiac actin gene: a highly conserved vertebrate gene. *Nucleic Acids Res.*, 13: 1223-1237.

Clarkson PM, Byrneswc KM, McCormick IP, White JS. (1986) Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric and concentric exercise. *Int. J. Sports Med.*, 7: 152-165.

Clarkson PM, Tremblay I. (1988) Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptations in humans. *J Appl Physiol.*, 65 : 1-5.

Clarkson PM, Nosaka K, Braun B. (1992) Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 24: 512–520.

Clarkson PM, Hubal MJ. (2002) Exercise-Induce muscle damage in humans. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, 81: 52-69.

Collinson PO, Boa FG, Gaze DC. (2001) Measurement of cardiac troponins. *Ann. Clin. Biochem.*, 38 (Pt 5): 423-49

Cummins B, Auck ML, Cummins P. (1987) Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *AM Heart J.*, 113 (6): 1333-1344.

De Robertis EDP, De Robertis EMF. (1987) Biología celular y molecular del músculo. *Ed. El Ateneo*, 173-189.

Derosier DJ, Tilney LG. (1984) The Form and Function of Actin. *Cell. Muscle Motil.*, 5:139-169.

Doyle JA, Sherman WM, Strauss RL. (1993) Effect of eccentric and concentric exercise on muscle glycogen replenishment. *Jour. Appli. Physiol.*, 74: 1848-1855.

Duan C, Hayes DA, Delp PD, Armstrong RB. (1990) Rat skeletal muscle mitochondrial calcium and injury from downhill walking. *J. Appl. Physiol.*, 68: 1241-1251.

Ebbeling CB, Clarkson PM. (1989) Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med.*, 7: 207-234.

Eisenberg E, Hill TL, Chen Y. (1980) Cross-bridge model of muscle contraction. *Biophys. J.*, 29: 195-227.

Engelman EH, Padron R. (1984) X-Ray diffraction evidence that actin is a 100 Å filament. *Nature*, 307: 56-58.

Engelman EH. (1985) The structure of F-actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 6:129-151.

Epstein MW, Herzog M. (1998) Theoretical Models of skeletal Muscle. *New York: Wiley.*

Evans WJ, Meredith CN, Cannon JG. (1986) Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. *J. Appl. Physiol.*, 61:1864–1868.

Evans WJ, Cannon JG. (1991) The metabolic effect of exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 19: 99-127.

Féasson I, Stockholm D, Freyssenet D, Richard I, Duguez S, Beckmann JS, Denis J. (2002) Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 543 (1): 297-306.

Firtel RA. (1981) Multigene families encoding actin and tubulin. *Cell*, 24:6-7.

Flynn MG, Pizza FX, Boone JB. (1994) Indices of training stress during competitive running and swimming seasons. *Int. J. Sports Med.*, 15: 21–26.

Forbes MJ, Sperelakis N. (1984) Ultrastructure of mammalian cardiac muscle. *Physiology and Pathophysiology of the heart*. Sperelakis, N. 3-24

Friden J, Sjøstrøm M, Ekblom B. (1983) Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *International Journal of Sports Medicine*, 4:170-176.

Fry RW, Morton AR, Keast D. (1991) Overtraining in athletes. *Sports Med.*, 12: 32-65.

Gerhardt W, Katus HA, Ravkilde J. (1992) Serum cardiac troponin T as a marker of ischemic myocardial injury. *Clin. Chem.*, 38: 1194-1195.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M. (2000) Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiol Rev.*, 80(2):853-924.

Grazi E, Trombetta G. (1986) Evaluation of the actin filament length from the time course of the depolymerization process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139 (1): 109-114.

Grazi E, Cintio O, Trombetta G. (2004) On the mechanics of the actin filament: the linear relationship between stiffness and yield strength allows estimation of the yield strength of thin filament in vivo. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 25(1):103-115.

Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T. (1982) Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 5901-5905.

Haller C. (1998) Cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease: absence of expression in truncal skeletal muscle. *Clin. Chem.*, 44 (5):930-8.

Hanson J. (1967) Axial period of actin filaments. *Nature*, 213: 353-356.

Harrington WF, Rodgers ME. (1984) Myosin. *Annu. Rev. Biochem.*, 53:35-73.

Hartobagyi T, Denahan T. (1989) Variability in creatine kinase: methodological, exercise and clinically related factors. *Int. J. Sports Med.*, 10: 69-80.

Hibberd, MG, Trentham DR. (1986) Relationships between chemical and mechanical events during molecular contraction. *Annu. Rev. Biophys Chem.*, 15: 119-161.

Hoberg E, Katus HA, Diederich KW. (1987) Myoglobin, creatine kinase-B isoenzyme, and myosin light chain release in patients with unstable angina pectoris. *Eur. Heart*, 8: 988-994.

Hurme T, Kalimo H. (1992) Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 24: 197-205.

Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA, Lorell BH, Shemin R, Grossman W. (1985) The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. *N. Engl. J. Med.*, 313:1050.

Jacobs SCJM, Wokke JH, Bär PR, Bootsma AL. (1995) Satellite cell activation after muscle damage in young and adult rats. *Anat. Rec.*, 242: 329-336.

Jaeschke H. (1995) Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 209: 104-111, 1995.

Jenkins RR. (1988) Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med.*, 5: 156-170.

Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, Van Peborgh J, Paoni NF. (2000) Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279(6): 2994-3002.

Johnson B, Adamczyk J, Tennos K, Stromme SA. (1976) comparación of concentric and eccentric muscle training. *Med. Sci. Sports*, 8: 35-38.

Jones MG, Swaminathan R. (1990) The clinical biochemistry of creatine kinase. *J. Int. Fed. Clin. Chem.*, 2: 108-114.

Kabsch W, Mannherz HG, Suck KD, Pai EF, Holmes KC. (1990) Atomic structure of the actin: Dnase I complex. *Nature*, 347: 37-44.

Katus HA. (1989) Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 21 (12):1349-1353.

Katus HA. (1992) Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin. Chem.* 38 (3): 386-393.

Kayashima S, Ohno H, Fujioka T, Taniguchi N, Nagata N. (1995) Leucocytosis as a marker of organ damage induced by chronic strenuous exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 70: 413-420.

Kenttä G, Hassmén P. (1998) Overtraining and recovery. A conceptual model. *Sports Med.*, 26: 1-16.

Koller A, Mair J, Schobersberger W, Wohlfarter T, Haid C, Mayr M, Villiger B, Frey W, Puschendorf B. (1998) Effects of prolonged strenuous endurance exercise on plasma myosin heavy chain fragments and other muscular proteins. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 38: 10-27.

Komulainen, H, Kytölä J, Vihko V. (1994). Running-induced muscle injury and myocellular enzyme release in rats. *J. Appl. Physiol.*, 77(5): 2299-2304.

Komulainen J, Takala T, Vihko V. (1995) Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats?. *Int. J. Sports Med.*, 16: 150-164.

Korn ED. (1982) Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.*, 62: 672-737.

Korn ED, Carlier MF, Pantaloni D. (1987) Actin Polymerization and Hydrolysis. *Science*, 238: 638-644.

Koutedakis Y, Raafat A, Sharp NC. (1993) Serum enzyme activities in individuals with different levels of physical fitness. *J. Sports. Med. Phys. Fitness*, 33:252–257.

Kuipers H, Keizer HA. (1988) Overtraining in elite athletes: review and directions for future. *Sports Med.*, 6: 79-92.

Kuipers H. (1993) Exercise-induced muscle damage. *Int. J. Sports Med.*,15: 132-145.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lang H. (1981) Creatine kinase isoenzymes- patophysiology and clinical application (review). *Berlin-Heidelberg-New York*, 4:1-10.

Larue C, Calzolari C, Bertinchant JP, Leclercq F, Grolleau R, Pau B. (1993) Cardiac-specific immunoenzymometric assay of troponin T in the early phase of acute myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 39: 972-979.

Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, Barstow TJ. (1997) The effects of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 29: 1036-1049.

Lee KN. (1994) Relevance of macro creatine kinase type 1 and type 2 isoenzymes to laboratory and clinical data. *Clin. Chem.*, 40: 1278-1283.

Lieber RL, Friden J. (1999) Mechanisms of muscle injury after eccentric Contraction. *J.. Sci.. Med. Sport.*, 2: 253-265.

Lin JJC, Lin JLC. (1986) Assembly of different isoforms of actin and tropomyosin into the skeletal tropomyosin-enriched microfilaments during differentiation of muscle cells in vitro. *J. Cell. Biol.*, 103: 2173-2183.

Lorenz M, Poole KJV, Popp D, Rosenbaum G, Holmes KC. (1995) An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. *J. Mol. Biol.*, 246: 108-119.

Luscher MS, Thygesen K, Ravkilde J. (1997) Applicability of cardiac troponin T and I for early risk stratification in unstable coronary artery disease. *Circulation*. 96: 2578-2585.

Lynn R, Talbot JA, Morgan DL. (1998) Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running. *J. Appl. Physiol.* 85: 98-104.

Mac Cully KK, Faulkner JA. (1986) Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.*, 61: 293-309.

Mair J, Thome-Kromer B, Wagner I, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B, Michel G. (1994) Concentration time courses of troponin and myosin subunits after acute myocardial infarction. *Coron. Artery Dis.*, 5: 865-872.

Malhotra A, Penpargkul S, Fein FS, Sonnenblick EH, Scheuer J. (1981) The effects of streptozotocin-induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins. *Cir. Res.*, 49: 1243-1250.

Mashiko T, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. (2004) Effects of exercise on the physical condition of college rugby players during summer training camp. *Br. J. Sports Med.*, 38(2): 186-90.

Masamichi Oh-Ishi, Maeda T. (2002) Separation techniques for high molecular mass proteins. *Journal of Chromatography*, 771(5): 49-66.

McComb RB. (1983) Homberger HA ed. *Clinical and Analytical Concepts in Enzymology*. College of American Pathologists.

Miller JB. (1991) Myoblasts, myosins, MyoDs and the diversification of muscle fibers. *Disorders*, 1: 7-17.

Milligan RA, Whittaker M, Safer D. (1990) Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature*, 348: 217-221.

Minty AJ, Alonso S, Caravatti M, Buckingham ME. (1982) A fetal skeletal muscle actin mRNA in the mouse and its identity with cardiac actin mRNA. *Cell*, 30: 185-192.

Misner JE, Massey BH, Williams BT. (1973) The effects of physical training on the response of serum enzymes to exercise stress. *Med. Sci. Sports*, 5: 86-98.

Missov E, Mair J. (1999) A novel approach to congestive heart failure: cardiac troponin T. *Am. Heart. J.*, 138: 95-99.

Moore PB, Huxley HE, Derosier DJ. (1970) Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *J.Mol. Biol.*, 50:279-295.

Nanji AA. (1983) Serum creatine kinase isoenzymes: a review. *Muscle and Nerve*, 6:83-90.

Newdy LK, Storrow AB, Gibler WB, Garvey JL, Tucker JF, Kaplan AL. (2001) Bedside multimarker testing for risk stratification in chest pain units. *Circulation*, 103: 1832-7.

Nishida S, Hiruma S, Hashimoto S. (1987) Immunohistochemical change of actin in experimental myocardial ischemia. Its usefulness to detect very early myocardial damages. *Histology And Histopathology*, 2(4): 417-428.

Nosaka K, Clarkson PM, McGuiggin ME, Byrne JM. (1991) Time course of muscle adaptation after high force eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 63: 70-76.

Nosaka K, Clarkson PM. (1996) Variability in serum creatine kinase response after eccentric exercise of the elbow flexors. *Int. J. Sports Med.*, 17: 120-127.

Offer G. (1974) The molecular basis of muscular contraction. *Companion to Biochemistry*. New York, pp. 623-671.

O'neil C, Stebbins C, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst J. (1996) Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J. Appl. Physiol.*, 81: 1197-1206.

Ogilvie RW, Armstrong RB, Baird KE, Bottoms CL. (1988) Lesions in rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *Am. J. Anat.*, 182: 335-346.

Ohman EM. (1982) Abnormal cardiac enzyme responses after strenuous exercise: alternative diagnostic aids. *Br. Med. J. (Clin Res Ed)*., 285 (6354):1523-1536.

Olerud JE, Homer LD, Carroll HW. (1976) Incidence of acute exertional rhabdomyolysis. Serum myoglobin and enzyme levels as indicators of muscle injury. *Arch. Intern. Med.*, 136: 692-697.

Oosawa F, Kasai M. (1971) Skeletal proteins. Subunits in Biological Systems. *Deker, New York*. 261-332.

Ordóñez J, Guindo J, Ferrer G. (1995) Utilidad de los marcadores bioquímicos en la detección del daño miocárdico asociado al infarto perioperatorio y al rechazo del trasplante cardiaco. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2: 77-84.

Pardo JV, Pittenger MF, Graig JW. (1983) Subcellular sorting of isoactins: Selective association of Y actin with skeletal muscle mitochondria. *Cell*, 23:1093-1103.

Peeze-Binkhorst FM, Kuipers H, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS. (1989) Exercise-induced focal skeletal muscle fiber degeneration and capillary morphology. *J. Appl. Physiol.*, 66: 2857-2865.

Perryman BH, Knoll JD, Roberts R. Carboxypeptidase-catalyzed hydrolysis of C-terminal lysine: Mechanism for in vivo production of multiple forms of creatin kinase in plasma. *Clin. Chem.*, 30:662-674.

Plaghki L. (1985) Régénération et myogenèse du muscle strié. *J. Physiol.*, 80: 51-110.

Pollard TD. (1986) Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells. *J. Cell Biochem.*, 31 (2): 87-95.

Prados J, Melguizo C, Aránega AE, Escobar F, Cobo V, González R, Aránega A. (1995) Circulating alpha-actin in non-insulin-dependent diabetics with autonomic dysfunction. *Int. J. Cardiol.*, 51: 127-130.

Prou E, Margaritis I, Tessier F, Marini JF. (1996) Effects of strenuous exercise on serum myosin heavy chain fragments in male athletes. *Int. J. Sports Med.*, 17: 263-277.

Ravkilde J. (1995) Independent prognostic value of serum creatine kinase isoenzyme MB mass, cardiac troponin T and myosin light chain levels in suspected acute myocardial infarction. Analysis of 28 months of follow-up in 196 patients. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 25 (3):574-581.

Rayment I, Holden HM. (1994) The Three dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 129-134.

Rodenburg JB, Bar PR, De Boer RW. (1993) Relations between muscle soreness and biochemical and functional outcomes of eccentric exercise. *Jour. Appl. Physiol.*, 74: 2976-2983.

Rogers MA, Stull GA, Apple FS. (1985) Creatine kinase isoenzyme activities in men and women following a marathon race. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 17: 679–82.

Rubinstein NA, Kelly AM. (1981) Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb. *J. Cell Biol.*, 90 : 128-144.

Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolow M, Rizzi C, Arslan P, Monti D, Franceschi C. (1995) Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett.*, 373: 291-305.

Santaló M, Guindo J, Ordóñez J. (2003) Marcadores biológicos de necrosis miocárdica. *Rev. Esp. Cardiol.*, 56(7): 703-720.

Sayers SP, Clarkson PM, Lee J. (2000) Activity and immobilization after eccentric exercise: I. Recovery of muscle function. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32: 1587–1592.

Schultz E. (1995) Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 21: S181-6. 80

Sen CK. (1995) Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.*, 79: 675-686.

Shave R, Dawson E, Whyte G, George K, Ball D, Collinson P, Gaze D. (2002) The cardiospecificity of the third-generation cTnT assay after exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 34(4):651-654.

Shave R, Dawson E, Whyte G, George K, Ball D. (2002) Markers of cardiac damage after two days of prolonged endurance exercise. *Jour. Sports Sci.*, 20 (1): 58.

Snow MH. (1977) Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing I. A fine structural study. *Anat. Rec.*, 188: 181-199.

Sorichter S, Mair J, Koller A, Gebert W, Rama D, Cazolari C, Artner-Dworzak E, Puschendorf B. (1997) Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced damage. *J. Appl. Physiol.*, 83: 1076-1082.

Squire JM, Al-Khayat HA, Yagi N. (1993) Muscle thin filament structure and regulations: actin subdomain movements and the tropomyosin shift modelled from low angle X-ray diffraction. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 89:2717-2726.

Stauber WT, Smith CA. (1998) Cellular responses in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol. Cell Biochem.*, 179: 189-196.

Stein W, Bohner J, Eggstein M, Lang H. (1983) Creatine kinase variants. Report on the workshop conference of the German Society for Clinical Chemistry. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 21: 859-876.

Stein W, Decker E. (1989) Post-transcriptional isoforms of CK: mechanisms and possible clinical applications. *Biologie Prospective, Paris: John Libbey Eurotext.* 235-241.

Sven Asp, Jens R, Dugaard, Søren Kristiansen, Bente Kiens, Erik A. (1998). Exercise metabolism in human skeletal muscle exposed to prior eccentric exercise. *Jour. of Physi.*, 509.1: 305-313.

Takagi Y, Yasuhara T, Gomi K. (2001) Creatine kinase and its isozymes. *Rinsho Byori.*, 116: 52-61.

Takahashi M, Lee L, Shi Q, Gawad Y, Jackowski G. (1996) Use of enzyme immunoassay for measurement of skeletal troponin-I utilizing isoform-specific monoclonal antibodies. *Clinical Biochemistry*, 29 (4): 301-308.

Takarada Y. (2003) Evaluation of muscle damage after a rugby match with special reference to tackle plays. *Br. J. Sports Med.*, 37: 416-419.

Tiidus PM. (1998) Radical species in inflammation and overtraining. *Can J Physiol Pharm.*, 76: 533-548.

Tsung SH. (1981) Several conditions causing elevation of serum CKMB and CKBB. *Am. J. Clin. Pathol.*, 75: 711-725.

Turi ZG, Rutherford JD, Roberts R, Muller JE, Jaffe AS, Rude RR. (1985) Electrocardiographic, enzymatic and escintigraphic criteria of acute myocardial infarction as determined from study of 726 patients (a MILIS study). *Am. J. Cardiol.*, 55: 1463-1485.

Urhausen A, Gabriel HHW, Weiler B, Kindermann W. (1998) Ergometric and psychological findings during overtraining: a long-term folowup study in endurance athletes. *Int. J. Sports Med.*, 19: 114-120.

Van Der Meulen JH, Kuipers H, Drukker J. (1991) Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. *J. Appl. Physiol.*, 71: 999-1004.

Vandekerckhove J, Bugaisky G, Buckingham M. (1986) Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actins proteins in various striated muscle tissues and cells. *J. Biol. Chem.*, 261: 1838-1843.

Velez C, Aranega AE, Marchal JA, Melguizo C, Prados J, Carrillo E, Aranega A. (2000) Development of chick cardiomyociyes: Modulation of intermediate filaments by basic fibroblast and platelet-derived growth factors” *Cell Tissue Organs*, 167: 163-170.

Vijayan K, Thompson JL, Riley DA. (1998) Sarcomere lesion damage occurs mainly in slow fibers of reloaded rat adductor longus muscles. *J. Appl. Physiol.*, 85: 1017-1023.

Von Arx P, Bantle S, Soldati T, Perriard JC. (1995) Dominant negative effect of cytoplasmic actin isoproteins on cardiomyocyte cytoarchitecture and function. *J. Cell Biol.*, 131: 1759-1773.

Wakabayashi T, Huxley HE, Amos LA, Klug A. (1975) Three-dimensional imege reconstruction of actin-tropomyosin complex and actin-tropomyosin-troponin T-troponon I complex. *J. Mol. Biol.* 93: 477-497.

Warber KD, Potter JD. (1986) Contractile proteins and phosphorylation. *The heart and cardiovascular system*. New York. Raven Press. Pp. 779-786.

Weeds AG, Pope B. (1971) Chemical studies on light chains from cardiac and skeletal muscle myosin. *Nature*, 234:85-88.

Whitehead NP, Allen TJ, Morgan DL, Proske U. (1998) Damage to human muscle from eccentric exercise after training with concentric exercise. *J. Physiol.*, 512: 615-20.

Wilkinson JM, Grand RJA. (1978) Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature*, 271: 31-35.

Wu HJ, Chen KT, Shee BW, Chang HC, Huang YJ, Yang RS. (2004) Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J. Gastroenterol.*, 15;10(18):2711-4.

Yao HW, Li J, Jin Y, Zhang YF, Li CY, Xu SY. (2003) Effect of leflunomide on immunological liver injury in mice. *World J. Gastroenterol*, 9: 320-323.

