

**UNIVERSIDAD DE GRANADA.**  
DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA.  
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.



**“EFECTOS DE LA MELATONINA, COENZIMA Q<sub>10</sub> Y  
*PHLEBODIUM DECUMANUM* SOBRE EL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN EL EJERCICIO FÍSICO INTENSO”.**

**TESIS DOCTORAL.**

**M<sup>a</sup> Carmen García Morales.**  
**Granada,**  
**2007**



**“EFECTOS DE LA MELATONINA, COENZIMA Q<sub>10</sub> Y  
*PHLEBODIUM DECUMANUM* SOBRE EL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN EL EJERCICIO FÍSICO INTENSO”.**

Memoria que presenta la Licenciada Dña. M<sup>a</sup> Carmen  
García Morales para aspirar al grado de Doctora en Ciencias.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:

Prof. Dr.D.Rafael Guisado Barrilao.

Prof. Dr.D. Julio José Ochoa Herrera.

Dr.D.Carlos de Teresa Galván.

Lda. Dña. M<sup>a</sup> Carmen García Morales,  
Aspirante al grado de Doctora en Ciencias.

Granada, Mayo 2007.

Dr. D. Rafael Guisado Barrilao, Catedrático del Departamento de Enfermería, de la Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud. Universidad de Granada.

Dr. D. Julio Ochoa Herrera, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada, profesor e investigador del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Dr. D. Carlos De Teresa Galván, Doctor en Medicina por la Universidad de Granada. Centro de Medicina Deportiva de Granada.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“EFECTOS DE LA MELATONINA, COENZIMA Q<sub>10</sub> Y *PHLEBODIUM DECUMANUM* SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EJERCICIO FÍSICO INTENSO”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por la Licenciada D<sup>ña</sup>. M<sup>a</sup> del Carmen García Morales, y la encontramos conforme para ser presentada, y aspirar al grado de Doctora por la Universidad de Granada por el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada, con fecha de nueve de Abril de dos mil siete.

Prof. Dr. D. Rafael Guisado  
Barrilao.

Prof. Dr. D. Julio Ochoa  
Herrera.

Dr. D. Carlos de Teresa  
Galván.

*A mis padres, que han sido para mí ejemplo de constancia y responsabilidad en el  
trabajo, aparte de muchas cosas más.*

*A Paco, al que llevaré en mi corazón toda mi vida.*

*A todos mis profesores y a todas aquellas personas de las que he aprendido hasta ahora  
todo cuanto sé.*

*A mis alumnos, presentes y futuros, de los que espero que puedan aprender de mí.*

## **PRÓLOGO.**

“Es intentando lo imposible como se realiza lo posible”.

(Henri Barsusse, 1873-1935).

“No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles, pero son difíciles porque no nos atrevemos a hacerlas”.

(Séneca, 4 AC-65).

Esta tesis que ahora acabo es un sueño hecho realidad para mí. Al escribir estas líneas detengo mis pensamientos para reflexionar y hacer balance de mi vida hasta llegar aquí. Desde pequeña me inculcaron el amor por el estudio y el trabajo bien hecho. Mi curiosidad innata de aprender ha posibilitado que haya disfrutado con mi formación académica y a pesar de que he tenido que realizar esfuerzos y sacrificios, tengo que decir que ha merecido sobradamente la pena, pero mis deseos de aprender no se han limitado sólo a lo estrictamente académico sino que he intentado siempre ampliarlos en diversos aspectos de mi vida, en una búsqueda constante de nuevos horizontes como medio para encontrar soluciones y mejorar como persona.

En mi camino me he encontrado con oportunidades y también serias dificultades y retos que la vida ha puesto ante mí, pero para superarlos siempre he contado con la ayuda inestimable de personas que me han apoyado o animado en el momento preciso. A todas esas personas mi eterna gratitud.

Una de esas personas ha sido mi profesor y director de tesis, el Dr. D. Rafael Guisado Barrilao. Fue él quien me sugirió realizar esta tesis doctoral, pero no sólo sugirió que la comenzara sino que he tenido la gran suerte de contar en todo este tiempo con su apoyo, ánimo continuo y confianza en mí para que la tesis fuese una realidad. He podido comprobar que a la vez que es un excelente profesional como docente y cirujano es una magnífica persona. Le estaré siempre eternamente agradecida.

Al mismo tiempo quiero agradecer efusivamente toda la labor realizada y dirección del Dr. D. Julio Ochoa Herrera que también ha hecho posible que este proyecto se haya podido materializar. Así como al Dr. D. Carlos de Teresa Galván por su ánimo y colaboración. Gracias a mis directores de tesis por su dedicación y su excelente guía. A los tres les agradezco que siempre hayan puesto a mi disposición sus conocimientos, su tiempo, sus consejos y lo que para mí fue más importante, haber sentido en todo momento su apoyo y su confianza.

Gracias a una amiga para mí, Dña. M<sup>a</sup> Carmen Vargas Corzo, médica especialista en Medicina Deportiva, por su generosidad y colaboración a la hora de comenzar la fase experimental, por sus consejos y por su buena disposición siempre.

Gracias al Dr. D. Francisco A. Ocaña Lara, profesor titular del Departamento de Estadística e Investigación Operativa de la Universidad de Granada, por su valiosa ayuda en el tratamiento estadístico de los resultados y por su continuo ánimo, apoyo e interés mostrado. Conocerle ha sido la sorpresa más grata y feliz de mi vida, todo mi cariño y afecto para tí.

Por supuesto, gracias al Dr. José Antonio González Jurado y a todos los que participaron en la extracción de las muestras y, cómo no, gracias a todos los sujetos participantes en el estudio.

Gracias al Departamento de Enfermería de la Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud, al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, gracias a mis profesores de Ciencias Biológicas y de Enfermería, y a todos los que directa o indirectamente han ayudado a la finalización de esta tesis.

**ÍNDICE.**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN (FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS).....</b>	<b>15</b>
<b>1. EJERCICIO FÍSICO Y SALUD .....</b>	<b>15</b>
1.1. Fisiología del ejercicio físico.....	19
1.1.1. Fases del ejercicio.....	20
1.1.1.1. Fase de entrada .....	21
1.1.1.2. Fase de estabilización .....	21
1.1.1.3. Fase de fatiga .....	22
1.1.1.4. Fase de recuperación .....	22
1.1.2. Adaptaciones orgánicas al ejercicio físico.....	22
1.1.2.1. Adaptaciones metabólicas .....	22
1.1.2.2. Adaptaciones circulatorias.....	24
1.1.2.3. Adaptaciones cardíacas .....	24
1.1.2.4. Adaptaciones respiratorias.....	25
1.1.2.5. Adaptaciones en sangre .....	25
1.1.3. Efectos beneficiosos del ejercicio físico.....	27
1.2. Ejercicio físico y sistema inmunitario .....	31
1.2.1. Efecto del ejercicio físico en las células inmunitarias.....	34
1.2.2. Ejercicio físico y sistema inmunitario en el envejecimiento .....	37
1.2.3. Efecto de los antioxidantes en el sistema inmunitario.....	45
1.3. Ejercicio físico y antioxidantes.....	49
<b>2. ESTRÉS OXIDATIVO .....</b>	<b>50</b>
2.1. Radicales libres.....	53
2.1.1. Tipos de radicales libres .....	55
2.1.1.1. Radical superóxido .....	56
2.1.1.2. Peróxido de hidrógeno.....	57
2.1.1.3. Radical hidroxilo .....	57
2.1.1.4. Oxígeno singlete .....	58
2.2. Mecanismos celulares de producción de radicales libres en el ejercicio.....	59
2.2.1. Cadena respiratoria mitocondrial .....	59



2.2.2. Xantina oxidasa .....	61
2.2.3. Metabolismo del ácido araquidónico.....	61
2.2.4. Fagocitos y otras fuentes de radicales .....	61
2.2.5. Metales en la producción de radicales libres.....	62
2.2.6. Activación de xenobióticos .....	63
2.2.7. Radiaciones ionizantes .....	63
2.3. Efectos de los radicales libres sobre los sistemas biológicos.....	64
2.3.1. Ácidos nucleicos y activación génica.....	64
2.3.2. Proteínas .....	65
2.3.3. Ácidos grasos insaturados. La peroxidación lipídica .....	67
2.3.4. Biomoléculas de bajo peso molecular .....	69
2.4. Respuesta adaptativa al estrés oxidativo .....	70
2.5. Regulación de la respuesta al estrés oxidativo .....	71
2.6. Transcendencia fisiopatológica del estrés oxidativo .....	71
3. ANTIOXIDANTES: MELATONINA, COENZIMA Q <sub>10</sub> y <i>PHLEBODIUM</i> <i>DECUMANUM</i> .....	73
3.1. Mecanismos antioxidantes enzimáticos.....	78
3.1.1. Superóxido dismutasa.....	78
3.1.2. Catalasa.....	79
3.1.3. Glutation peroxidasa.....	80
3.1.4. Glutation reductasa .....	80
3.2. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos .....	81
3.2.1. Vitamina E.....	81
3.2.2. Ubiquinona .....	82
3.2.3. β-carotenos .....	82
3.2.4. Ácido ascórbico. ....	83
3.2.5. Otros antioxidantes. ....	83
3.3. Melatonina.....	83
3.4. Coenzima Q <sub>10</sub> .....	89
3.5. <i>Phlebodium decumanum</i> .....	95
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE ESTUDIO.....	101

4.1. Objetivos generales .....	102
4.2. Objetivos específicos.....	103
4.3. Hipótesis .....	103
<b>CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>104</b>
1. MUESTRA POBLACIONAL.....	104
1.1. Selección de la muestra .....	104
1.2. Valoración médica del adulto que realiza ejercicio físico.....	105
2. DISEÑO Y MÉTODO EXPERIMENTAL.....	109
2.1. Características de la prueba de esfuerzo físico.....	109
2.2. Definición de las variables de estudio .....	117
2.2.1. Variables independientes.....	118
2.2.1.1. Aporte nutricional de Melatonina.....	118
2.2.1.2. Aporte nutricional de Coenzima Q <sub>10</sub> .....	118
2.2.1.3. Aporte nutricional de <i>Phlebodium decumanum</i> .....	118
2.2.1.4. Aporte nutricional de placebo.....	119
2.2.2. Variables dependientes.....	119
2.2.2.1. Parámetros plasmáticos bioquímicos e inflamatorios.....	119
2.2.2.2. Parámetros sanguíneos eritrocitarios.....	119
2.2.2.3. Parámetros en orina.....	120
2.2.3. Variables control.....	120
2.3. Instrumental y métodos de medida.....	120
2.4. Método estadístico.....	122
2.4.1. Estudio descriptivo de los datos.....	124
2.4.2. Inferencia estadística.....	125
2.5. Método bibliográfico.....	126
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	126
3.1. OBTENCIÓN DE PLASMA, CITOSOL Y MEMBRANAS DE ERITROCITO PARA ANÁLISIS .....	127
3.2. DETERMINACIONES PARÁMETROS PLASMÁTICOS BIOQUÍMICOS	
3.2.1. Bilirrubina total .....	128

3.2.2. Proteínas totales plasmáticas .....	129
3.2.3. Colesterol total .....	130
3.2.4. Triglicéridos .....	132
3.2.5. Fosfolípidos .....	134
<b>3.3. DETERMINACIONES PARÁMETROS PLASMÁTICOS INFLAMATORIOS.</b>	
3.3.1. Determinación de los niveles de TNF- $\alpha$ en plasma. ....	135
3.3.2. Determinación de los niveles de IL-6 en plasma.....	136
3.3.3. Determinación de los niveles del receptor soluble tipo-II del TNF- $\alpha$ (sTNF-rII) en plasma .....	138
3.3.4. Determinación de los niveles del receptor antagonista de la interleukina-1 (IL-1ra) en plasma .....	139
<b>3.4. OTRAS DETERMINACIONES EN PLASMA .....</b>	<b>140</b>
3.4.1. Viscosidad plasmática .....	140
3.4.2. Melatonina .....	141
3.4.3. Capacidad antioxidativa total .....	142
<b>3.5. DETERMINACIONES EN ERITROCITO .....</b>	<b>143</b>
3.5.1. Proteínas citosol y membrana.....	143
3.5.2. Medida de la concentración de hidroperóxidos basales e inducidos en membrana de eritrocito.....	144
3.5.3. Determinación hemoglobina citosol.....	146
<b>3.6. DETERMINACIONES EN ORINA .....</b>	<b>147</b>
3.6.1. Determinación de 8-hidroxi guanosina.....	147
3.6.2. Determinación de creatinina.....	148
 <b>CAPÍTULO III. RESULTADOS. ....</b>	 <b>150</b>
<b>1. VARIABLES SANGUÍNEAS. ....</b>	<b>150</b>
<b>1.1. PARÁMETROS PLASMÁTICOS BIOQUÍMICOS.....</b>	<b>150</b>
1.1.1. Bilirrubina total. ....	150
1.1.2. Colesterol total.....	153
1.1.3. Fosfolípidos. ....	155
1.1.4. Triglicéridos .....	157
1.1.5. Proteínas totales.....	160

1.2. PARÁMETROS PLASMÁTICOS INFLAMATORIOS.....	162
1.2.1. Interleukina-6.....	162
1.2.2. TNF- $\alpha$ .....	163
1.2.3. Receptor antagonista de la interleukina-1.....	166
1.2.4. Receptor soluble tipo II del TNF- $\alpha$ .....	169
1.3. OTRAS DETERMINACIONES EN PLASMA.....	172
1.3.1. Viscosidad plasmática.....	172
1.3.2. Melatonina.....	173
1.3.3. Capacidad antioxidativa total.....	177
1.4. PARÁMETROS ERITROCITARIOS.....	180
1.4.1. Proteínas de citosol de eritrocito.....	180
1.4.2. Proteínas de membrana de eritrocito.....	182
1.4.3. Hemoglobina en citosol de eritrocito.....	184
1.4.4. Hidroperóxidos de membrana de eritrocitos basales.....	186
1.4.5. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH.....	188
1.5. DETERMINACIONES EN ORINA.....	191
1.5.1. 8-hidroxi guanosina.....	191
1.5.2. Creatinina.....	192
<b>CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>241</b>
1. RESPECTO DE LAS VARIABLES SANGUÍNEAS.....	242
1.1. RESPECTO DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS BIOQUÍMICOS.....	242
1.1.1. Niveles de bilirrubina total.....	242
1.1.2. Niveles de colesterol total.....	243
1.1.3. Niveles de fosfolípidos.....	245
1.1.4. Niveles de triglicéridos.....	246
1.1.5. Niveles de proteínas totales.....	247
1.2. RESPECTO DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS	
INFLAMATORIOS.....	249
1.2.1. Citoquinas.....	249
1.2.1.1. Citoquinas proinflamatorias.....	252

1.2.1.1.1. Interleukina-6.....	253
1.2.1.1.2. TNF- $\alpha$ .....	255
1.2.1.2. Citoquinas antiinflamatorias.....	257
1.2.1.2.1. Receptor antagonista de la interleukina-1. ....	257
1.2.1.2.2. Receptor soluble II del TNF- $\alpha$ .....	259
1.3. RESPECTO DE OTRAS DETERMINACIONES EN PLASMA .....	260
1.3.1. Viscosidad plasmática .....	260
1.3.2. Melatonina.....	261
1.3.3. Capacidad antioxidativa total .....	263
1.4. RESPECTO DE LAS DETERMINACIONES EN ERITROCITO .....	264
1.4.1. Niveles de proteínas en citosol de eritrocito.....	265
1.4.2. Niveles de proteínas de membrana de eritrocito.. .	266
1.4.3. Niveles de Hemoglobina en citosol de eritrocito.....	266
1.4.4. Niveles de hidroperóxidos de membrana de eritrocito basales. ....	267
1.4.5. Niveles de hidroperóxidos de membrana de eritrocito inducidos con AAPH .....	269
1. RESPECTO DE LAS DETERMINACIONES EN ORINA. ....	269
1.1. Niveles de 8-hidroxiguanosina. ....	269
1.2. Niveles de creatinina. ....	271
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>273</b>
<b>CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS FUTURAS. ....</b>	<b>274</b>
<b>CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>275</b>
<b>CAPÍTULO VIII. ANEXOS.....</b>	<b>306</b>
1. INDICE DE FIGURAS .....	309
2. ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS E ILUSTRACIONES.....	309
3. ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	309
4. ÍNDICE DE TABLAS.....	311

### **RESUMEN.**

En la actualidad, se recomienda la práctica regular del ejercicio físico como hábito saludable para promocionar la salud, prevenir enfermedades y mejorar nuestra calidad de vida. Existen numerosas aportaciones en la bibliografía científica en las que se nos informa que el ejercicio físico intenso induce un estrés oxidativo y puede ocasionar alteraciones en el sistema inmune, por lo que cabe preguntarse sobre las causas bioquímicas de este proceso, encontrando entre ellas la acción que diariamente tienen los radicales libres sobre cada una de nuestras células, proceso que debido a su trascendencia tiene repercusiones sobre nuestra salud. Hay un gran interés en conocer la asociación entre estrés oxidativo y actividad física, así como en ver la relación que existe entre el ejercicio físico y el sistema inmune.

Si entendemos el estrés oxidativo como la ruptura de un equilibrio entre compuestos que alteran las macromoléculas y estructuras celulares (prooxidantes) y compuestos que las protegen (antioxidantes), teniendo como consecuencia este desequilibrio una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que provocan un deterioro o un daño para la célula, hay que profundizar en el conocimiento de los mecanismos de defensa frente a esos compuestos prooxidantes o radicales libres que se generan en el metabolismo celular como resultado de las complejas rutas metabólicas secuenciales de óxido-reducción que constituyen la esencia misma de la vida a nivel bioquímico. Varios trabajos científicos demuestran que existe inducción de estrés oxidativo en individuos sujetos a intenso ejercicio físico ya que sería un mecanismo generador de radicales libres, pero al mismo tiempo se ha comprobado que en estos individuos aumentan las defensas antioxidantes tanto enzimáticas como mediadas por atrapantes de radicales libres de bajo peso molecular.

Estos mecanismos de defensa antioxidantes se encuentran en compuestos segregados por el propio organismo, como es el caso de la melatonina, que es una secreción hormonal de la epíffisis o glándula pineal perfectamente protegida en la cavidad craneal, cuya actividad es dependiente del ciclo circadiano de luz-oscuridad. Esta protección anatómica, su dependencia del ciclo circadiano y el hecho de ser una glándula de regulación neuro-endocrina puede evidenciar su importante papel fisiológico en el mantenimiento de la vida; o bien son aportados los antioxidantes como nutrientes específicos en determinados alimentos en una adecuada alimentación que conlleva una correcta nutrición del organismo.

Por otra parte, se ha comprobado que la actividad física conlleva una variación de las lipoproteínas plasmáticas, con la consiguiente disminución del riesgo coronario. Hay varios trabajos que demuestran la implicación de la peroxidación lipídica de las fracciones proaterogénicas en el desarrollo de la aterosclerosis, la cual podría prevenirse, por lo tanto, mediante un adecuado entrenamiento físico.

Por todos los motivos expuestos anteriormente, en este estudio se analiza la influencia de la suplementación con antioxidantes sobre marcadores de inflamación (citoquinas) y su relación con el estrés oxidativo que se produce después del ejercicio.

Se pretende comprobar los riesgos o beneficios potenciales de la práctica del ejercicio a nivel bioquímico y se analiza el papel de la Melatonina, del *Phlebodium decumanum* y de la coenzima Q<sub>10</sub> presuntamente protectores oxidativos, en situaciones en las que se produce una liberación excesiva de radicales libres, como sucede en la práctica del ejercicio físico intenso en una muestra poblacional de deportistas habituales que realizan una carrera de subida de largo recorrido desde Granada capital hasta Sierra Nevada, por la manipulación de dos variables: efecto del ejercicio en sí sin considerar el uso de antioxidantes y el efecto del aporte nutricional de los suplementos objeto de estudio en los distintos grupos antes y después del ejercicio. En la investigación se estudian las respuestas al ejercicio físico intenso con un diseño que permitirá analizar el efecto de cada variable. Con este propósito, se definen como variables dependientes: parámetros plasmáticos (bioquímicos: bilirrubina total, colesterol total, fosfolípidos, triglicéridos, proteínas en plasma; inflamatorios: IL-6, IL1-ra, TNF-alfa, sTNF-rII; y otros: viscosidad plasmática, capacidad antioxidativa en plasma), determinaciones en eritrocito (proteínas en citosol y membrana de eritrocito, hemoglobina en citosol de eritrocito, hidroperóxidos de membrana de eritrocito basales, hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH) y determinaciones en orina (8-hidroxi-guanosina en orina, indicador de daño oxidativo, y creatinina). Después de realizar el análisis estadístico se observan diferencias significativas en las variables indicativas de daño oxidativo después de realizarse la prueba de ejercicio físico, existiendo una mayor protección oxidativa en los grupos que han ingerido los suplementos administrados con respecto al grupo placebo. Por lo que podemos concluir que los resultados del estudio son optimistas y alentadores en cuanto a la disminución de la disfunción inmune y los riesgos oxidativos potenciales del ejercicio físico intenso.

## 1. EJERCICIO FÍSICO Y SALUD.

*“Todas aquellas partes del cuerpo que tienen una función, si se usan con moderación y se ejercitan en el trabajo para el que están hechas, se conservan sanas, bien desarrolladas y envejecen lentamente, pero si no se usan, se convierten en enfermizas, defectuosas en su crecimiento y envejecen antes de hora”.*  
(Hipócrates).

El hombre primitivo, durante el Paleolítico era cazador y recolector, utilizaba la fuerza muscular como fuente de energía para sobrevivir. Con el paso de los siglos y la invención de diversos instrumentos comenzó a utilizar otras fuentes de energía. Con el desarrollo tecnológico progresivo que ha realizado la humanidad, y sobre todo a partir de la Revolución Industrial (finales del s.XVIII y principios del s.XIX), comienza un frenético consumo energías no renovables que posibilitan un desarrollo económico, pero supone un descenso paulatino de la práctica de ejercicio físico; ya que debido a esos avances tecnológicos la vida de la humanidad se ha transformado en cuanto a las condiciones de vida y trabajo en los países desarrollados y se hace cada vez más fácil y cómoda ...pero más sedentaria. El esfuerzo físico de diversas ocupaciones y actividades laborales ha disminuido hasta el punto de que los requerimientos energéticos son escasos. El progreso ha representado una de las causas que ha promovido el sedentarismo con todas las ventajas desde el punto de vista social pero con los inconvenientes para la salud.

El hábito de realizar ejercicio físico se asocia normalmente a la infancia y a la adolescencia, pero al llegar a la vida adulta las obligaciones profesionales, los cambios del estilo de vida y otras circunstancias son barreras que limitan la práctica del ejercicio físico de una manera regular y eficaz. La poca actividad física asociada a diversos factores de riesgo para la salud conforman un perfil bastante común en la población adulta.

El concepto de salud ha ido evolucionando a lo largo del tiempo. Frente al concepto clásico en el que se definía la salud como ausencia de enfermedades e invalideces, siendo una definición en términos negativos y poco operativa, fueron apareciendo otras definiciones de diversos autores.

Así, en 1946 la OMS define la salud como el estado de completo bienestar físico,



*Tesis Doctoral* \_\_\_\_\_ *INTRODUCCIÓN*  
mental y social. Es un concepto utópico, amplio, estático y subjetivo aunque mide la salud en términos positivos y contempla al hombre en su integridad, ya que se tienen en cuenta todas las dimensiones del ser humano.

Milton Terris (1964) define la salud como “el estado de bienestar físico, mental y social con capacidad de funcionamiento”. Elimina el vocablo “completo” por lo que es una definición menos utópica a la vez que señala un aspecto objetivo (el funcionamiento del individuo).

Salleras (1985) propone como concepto de salud el siguiente: “el más alto logro de bienestar físico, mental y social con capacidad de funcionamiento que permitan los factores sociales en los que vive inmerso el individuo y la colectividad”.

Para Wyle, la salud es “el continuo y perfecto ajustamiento del hombre a su medio ambiente” que estaría determinado por todas las circunstancias internas y externas al individuo ante las cuales el hombre se adapta o muere.

Podemos entender la salud y la enfermedad en un eje axial continuo (salud---enfermedad) en el que existiría diversas graduaciones en los que se encontraría cada individuo.

Entre los determinantes de la salud como factores fundamentales para conservarla y evitar la aparición de enfermedades cabe destacar los siguientes:

- Los factores hereditarios y la edad que no pueden ser modificados en la actualidad.
- Un medio ambiente sano, libre de elementos biológicos patógenos, físicos (radiaciones y ruidos), químicos (venenos y contaminantes químicos) y otros (agresividad, violencia, etc...) perjudiciales para la salud. Según algunos estudios, la influencia del medio ambiente en el mantenimiento de la salud es considerable, pues representa el 35 %.
- La existencia de un sistema sanitario capaz de desarrollar una eficaz política de sanidad pública para tanto la prevención como para el tratamiento de enfermedades.
- La adquisición de hábitos y estilos de vida saludables, otro factor de suma importancia, ya que se considera que el 31% de la salud depende de él. Precisamente, la práctica adecuada de ejercicio físico se incluye como hábito de vida saludable.

Por tanto, la salud depende del estilo de vida de las personas que a su vez determina una calidad de vida (Coreil, J. et al, 1992), siendo el estilo de vida “el conjunto de patrones de conducta que caracterizan la manera general de vivir de un individuo o grupo” (Mendoza, R. et al, 1994).

En la actualidad, se han realizado cuantiosos estudios que han demostrado la relación entre los cambios en los hábitos de vida de las sociedades desarrolladas y la proliferación de determinadas patologías (Noble, JJ. et al, 1997; Aspray, TJ., et al, 2000).

Entre los comportamientos que son favorables para la salud podemos citar: dieta equilibrada, variada y suficiente que supondría una correcta nutrición del organismo, evitar hábitos tóxicos como fumar o beber alcohol en exceso, pautas de descanso regulares y de duración apropiada y **una actividad física realizada con una frecuencia, intensidad y duración adecuadas** (Shephard, R., 1995).

En definitiva, la práctica de una actividad física adecuada dentro del estilo de vida aparece como un elemento necesario para mantener un nivel óptimo de salud y elevar la calidad de vida.

#### ✚ **Argumentos que influyen en la decisión de hacer ejercicio físico.**

La decisión de hacer ejercicio físico es un impulso de autoestima y mejora de la propia imagen. La pérdida de las cualidades físicas, que se pone de manifiesto por la disminución de la tolerancia al esfuerzo, la flexibilidad y el tono muscular, es otro de los argumentos que influyen a la hora de tomar la decisión de muchas personas sedentarias de modificar sus hábitos.

La recomendación del ejercicio físico por parte del médico es una medida cada vez más extendida. Los médicos han pasado de recomendar el reposo absoluto para la curación de la mayoría de las enfermedades a ser entusiastas defensores de la práctica de ejercicio físico para la prevención y el tratamiento de muchas afecciones. (Serra, G., et al, 2004).

El argumento más importante para promocionar el ejercicio físico consiste en que es necesario para promover y mejorar la salud, pero a pesar de existir sobradas evidencias sobre la conveniencia de la práctica del ejercicio físico, es común a veces su realización a intensidades superiores a las adecuadas.

### ■ **Antecedentes de actividad física.**

Dentro de la población adulta podemos establecer diferentes subgrupos en función de la historia de actividad física que presentan. Los antecedentes personales en cuanto a la práctica de ejercicio físico regular van a condicionar los programas de ejercicio físico adecuados.

Por tanto podemos diferenciar:

1. Adultos físicamente activos, con un antecedente de práctica de ejercicio físico regular.
2. Adultos que han ido intercalando períodos de actividad con períodos de inactividad.
3. Adultos físicamente activos, que han iniciado su actividad en la edad adulta.
4. Adultos sedentarios, con precedentes de actividad física o no.

### ■ **Desarrollo ontogénico de las cualidades físicas.**

La edad adulta es una etapa muy amplia que se inicia con un máximo apogeo del desarrollo de las cualidades físicas e incluye el inicio de su regresión. Estas personas se verán beneficiadas por una vida físicamente activa que retarde y suavice este proceso involutivo y suponga un beneficio para la salud. Las cualidades físicas a destacar son:

#### a) Fuerza.

Los registros máximos de fuerza se alcanzan alrededor de la segunda década para los varones y unos pocos años antes para las mujeres. La fuerza de una persona de 65 años es como promedio el 75-80% de la que alcanza entre los 20 y 30 años (*Astrand, P., Rodahl, K., 2000*). La disminución de los registros máximos de fuerza con la edad parece ir paralela a la reducción de la masa muscular (disminución del volumen y número de fibras musculares). La regresión afecta a todas las manifestaciones de la fuerza, especialmente de la fuerza rápida.

#### b) Resistencia.

La capacidad aeróbica ( $VO_2$  máx) disminuye aproximadamente un 10 % por década en las personas relativamente sedentarias a partir de los 25 años. Con el paso de

los años, el ejercicio anaeróbico es peor tolerado por la pérdida natural de las propiedades del músculo, la menor tolerancia a los cambios metabólicos y los ritmos rápidos en los que la exigencia cardiocirculatoria es elevada.

c) Velocidad.

A partir de la segunda o tercera décadas de la vida, dependiendo de que se sea una persona físicamente activa o no, se produce una disminución de la velocidad de ejecución de los movimientos que se manifiesta tanto deportivamente como en las actividades de la vida diaria.

Las causas de esta involución se deben a la disminución de la capacidad de movimiento relacionado con la fuerza: pérdida de la masa muscular, de las fibras de contracción rápida y del número de fibras musculares en general, así como un descenso de la capacidad del sistema de control del movimiento.

d) Flexibilidad.

Es una cualidad física que tiene su máximo desarrollo en las primeras etapas de la vida.

Con el paso de los años y el sedentarismo:

-Los músculos se vuelven cada vez más rígidos. Paralelamente a la atrofia muscular, con el envejecimiento, tiene lugar la sustitución del tejido adiposo y fibroso, cambios que parecen ser responsables de la pérdida de flexibilidad con la edad.

-Las articulaciones pierden movilidad.

-La variedad natural de movimientos se reduce.

e) Coordinación.

La fase del aprendizaje motor se realiza a edades tempranas. En la edad adulta van descendiendo progresivamente los mecanismos de control del movimiento.

### **1.1. Fisiología del ejercicio físico.**

Podíamos diferenciar de una forma global los ejercicios físicos generales que son los no agrupados en el deporte de los competitivos. Se pueden clasificar siguiendo varios criterios:

- 1) Según el volumen de la masa muscular.
  - Local: ejercicio que involucra menos de 1/3 de la masa muscular total, ej. los ejercicios de miembros superiores o inferiores.
  - Regional: ejercicio que involucra entre 1/3 a 1/2 de la masa muscular total, ej. miembros superiores y tronco.
  - Globales: ejercicio en el que participa más de la mitad del volumen de la masa muscular total provocando cambios en el organismo.
- 2) Según el tipo de contracción.
  - Dinámicos: llamados también isotónicos en los que hay una modificación métrica del músculo.
  - Estáticos: llamados también isométricos en los que predomina la energía anaerobia y son de escasa duración.
- 3) Según la fuerza y la potencia.
  - ejercicios de fuerza: en ellos se emplea más del 50 % de la capacidad de fuerza del individuo.
  - ejercicios de velocidad: en los que se emplea un 30 a 50 % de la fuerza de un individuo.
  - ejercicios de duración: la cantidad de fuerza empleada es mínima.
- 4) Según costos funcionales.

En este punto se consideran algunos indicadores como los siguientes:

  - MET: consumo de O<sub>2</sub> en ml/min. en estado de reposo por kg. de peso.
  - VO<sub>2</sub>: volumen de consumo de O<sub>2</sub>.
  - FC: frecuencia cardíaca.
  - T<sup>a</sup>: temperatura en °C.
  - Lact.: producción de lactato.

### 1.1.1. Fases del ejercicio.

Podemos considerar al ejercicio físico como un estrés impuesto al organismo, que responde con un síndrome de adaptación y cuyo resultado puede ser la forma deportiva o la sobrecarga, según sea la magnitud de la carga aplicada. La sobrecarga se produce cuando la magnitud de la carga supera la capacidad del organismo. Es útil clarificar los siguientes conceptos:

- carga: fuerza que se ejerce sobre los músculos.
- volumen de carga: está representada por la cantidad de la misma (km. recorridos, horas de duración).
- intensidad de carga: es el volumen de la carga en función del tiempo.
- capacidad de trabajo: denota la energía total disponible.
- potencia: significa energía por unidad de tiempo.

En el ejercicio físico se producen dos tipos de adaptaciones:

La adaptación aguda es la que tiene lugar en el transcurso del ejercicio físico.

La adaptación crónica es la que se manifiesta por los cambios estructurales y funcionales de las distintas adaptaciones agudas (cuando el ejercicio es repetido y continuo), por ejemplo, el aumento de mitocondrias musculares, agrandamiento cardíaco, incremento del consumo máximo de oxígeno ( $VO_2$ ), disminución de la frecuencia cardíaca, incremento de la capacidad oxidativa del músculo, etc.

Durante el esfuerzo están presentes las siguientes fases:

#### 1.1.1.1. Fase de entrada.

Es el estado funcional que tiene lugar desde el estado de reposo al de actividad. Se dice que es heterocrónica, porque no todas las funciones mecánicas comienzan simultáneamente (ej. presión arterial, volumen minuto, transporte de  $O_2$ , etc). En esta fase predominan los procesos anaerobios, porque no hay correspondencia entre la oferta y la demanda de oxígeno (ajuste circulatorio inadecuado).

Después de la fase de entrada y antes de la de estabilización se produce un estado de “punto muerto”, donde la capacidad de trabajo desciende notablemente. A continuación viene el denominado “segundo aliento” que es cuando comienza la fase de estabilización.

#### 1.1.1.2. Fase de estabilización.

Es predominantemente aeróbica y cuando se sobrepasa pasamos a la fase siguiente. Cuando el individuo se encuentra en el “punto muerto” que tiene lugar durante los primeros minutos del ejercicio, la carga parece muy agotadora. Puede experimentarse disnea (sensación de falta de aire), pero la dificultad finalmente cede. Los factores que provocan esta dificultad pueden ser una acumulación de metabolitos en los músculos activados y en la sangre por que el transporte de oxígeno es insuficiente para satisfacer las demandas.

Durante el comienzo de un ejercicio pesado, hay una hipoventilación debido al hecho de que hay una demora en la regulación química de la respiración (falta de adecuación longitud/tensión en los músculos intercostales. Cuando se produce el “segundo aliento”, la respiración aumenta y se ajusta a los requerimientos. Parece que los músculos respiratorios son forzados a trabajar anaeróbicamente durante las fases iniciales del ejercicio si hay una demora en la redistribución de la sangre. Entonces se puede producir un dolor punzante en el costado, que probablemente sea resultado de una hipoxia en el diafragma. Conforme la irrigación de los músculos mejora, el dolor desaparece. Aunque un desencadenante alternativo de este dolor puede ser un estímulo de origen mecánico de receptores del dolor en la región abdominal.

#### 1.1.1.3. Fase de fatiga.

Se produce por agotamiento de las reservas y por acumulación del ácido láctico.

#### 1.1.1.4. Fase de recuperación.

Es la que comienza una vez terminado el ejercicio físico. En esta fase hay una disminución paulatina de la captación de O<sub>2</sub>, con un componente rápido que representa el costo de energía necesaria para formar el ATP y la fosfocreatina gastados y saturar la mioglobina muscular. Después hay un componente lento relacionado principalmente con la síntesis del glucógeno consumido, la eliminación de las catecolaminas remanentes y el descenso la temperatura residual. En este periodo la captación de glucosa por el músculo es 3 ó 4 veces la de reposo.

### 1.1.2. Adaptaciones orgánicas en el ejercicio.

Durante el ejercicio se producen modificaciones adecuadas y coordinadas en todo el organismo, las cuales se especifican a continuación:

#### A. Adaptaciones metabólicas.

El ATP es la única fuente de energía para formar y romper puentes transversales durante la contracción de los sarcómeros. Los sistemas metabólicos

musculares son:

- la reserva de ATP acumulados intracelularmente.
- la conversión de las reservas de alta energía de la forma de fosfocreatina a ATP.
- la génesis de ATP mediante la glucólisis anaeróbica.
- metabolismo oxidativo del acetil-CoA.

Con el comienzo del ejercicio de intensidad moderada a grande, la transferencia de fosfato y la glucólisis anaeróbica representan las fuentes iniciales de combustible para reponer el ATP consumido. Los niveles de glucógeno y fosfocreatina descienden rápidamente aumentando la concentración de lactato en la célula. La preferencia inicial de estas vías metabólicas, está relacionada con la necesidad inmediata de producción de ATP. El metabolismo oxidativo es mucho más lento requiriendo una mayor captación de sustrato y de oxígeno, los cuales necesitan una intensificación del flujo sanguíneo.

Para el músculo esquelético el transporte de oxígeno y sustratos determina el nivel de rendimiento del trabajo submáximo de duración apreciable. En el músculo en reposo el cociente respiratorio ( $CR = VCO_2 / VO_2$ ) se acerca a 0,7 (normal en el organismo en reposo = 0,82).

Durante los ejercicios prolongados se produce la utilización de una secuencia de combustibles. En la fase inicial del ejercicio el glucógeno muscular constituye la principal fuente de energía consumida. El índice de glucogenólisis muscular es más elevado durante los primeros 5 a 10 minutos, entre los 10 a 40 minutos aumenta de 7 a 20 veces la captación de la glucosa, representando el 30 al 40 % del consumo de oxígeno total. Si el ejercicio continúa más de 40 minutos la utilización de glucosa sanguínea alcanza su pico máximo entre los 90 y 180 minutos, declinando luego, aumentando progresivamente la utilización de ácidos grasos libres. En el ejercicio de corta duración de baja a moderada intensidad, la concentración de glucosa en sangre prácticamente no se modifica con relación a la glucemia en reposo. Si es intenso puede observarse una elevación leve de la glucemia (20 a 30 mg/dl). En el ejercicio prolongado (más de 90 minutos) la glucemia desciende entre 10 a 40 mg/dl. El hígado representa el único sitio de producción y liberación de glucosa al torrente sanguíneo y debe tratar de equilibrar el consumo de glucosa por parte del músculo. En reposo el índice de producción de glucosa hepática es de 150 mg/min., del cual el 75 % es glucogenólisis y el resto es gluconeogénesis a partir de alanina, lactato, piruvato y glicerol. El ejercicio de corta duración el aumento de liberación de glucosa hepática es a



expensas de la glucogenólisis. A medida que el ejercicio se prolonga hay mayor dependencia de la captación del precursor gluconeogénico para mantener la producción de glucosa hepática.

La respuesta hormonal al ejercicio se caracteriza por descenso de insulina y aumento de glucagón. Además aumentan la somatotrofina, adrenalina, noradrenalina y cortisol. La importancia fisiológica de alteración del medio hormonal en el ejercicio se relaciona más con el estímulo de producción hepática de glucosa que con el aumento de utilización de ésta.

#### B. Adaptaciones circulatorias.

Durante el ejercicio el mayor requerimiento de oxígeno por los músculos es solventado por un aumento del aporte sanguíneo a ellos debido a que el corazón bombea más sangre por minuto y a que se desvía sangre desde los tejidos menos activos hacia el sistema muscular. Para ello, aumenta la presión sanguínea arterial (PA). El aumento del volumen sistólico (VS) del corazón supone que se expulse mayor volumen de sangre hacia la aorta durante la sístole. Si la resistencia periférica de las arteriolas permanece constante, la distensión de las arterias debe aumentar para dar cabida a esa masa de sangre, y la presión sistólica se eleva a un nivel mayor antes de que el flujo de salida pueda equilibrar el flujo de entrada. La PA es afectada por la postura corporal ya que al pasar del decúbito a posición parada se produce caída momentánea de la presión a consecuencia del menor retorno venoso.

La adecuación del flujo sanguíneo a las necesidades metabólicas de los tejidos comprende la dilatación de las arteriolas en los tejidos activos y la constricción compensatoria de arteriolas en tejidos menos activos (piel y órganos abdominales). El corazón y el cerebro requieren una irrigación buena en todo momento y no participan en la vasoconstricción compensatoria del ejercicio. El calibre de los vasos es regulado por factores nerviosos, mecánicos y químicos. La vasodilatación del músculo esquelético durante el ejercicio se debe a la acción directa de modificaciones químicas locales sobre los vasos sanguíneos como una mayor concentración de ácido láctico.

#### C. Adaptaciones cardíacas.

La frecuencia cardíaca (FC) normal oscila entre 60 y 100 latidos/min. siendo mayor en las mujeres que en los hombres. Existe una tendencia a que la FC sea más baja en

personas que tienen una buena condición física que en las personas no deportistas. Durante el ejercicio existe un aumento evidente de la FC dependiendo de la velocidad y duración del ejercicio, el estado emocional, la temperatura ambiente, la humedad y la capacidad física del individuo. La máxima FC tiene lugar en la fase estable del ejercicio tiene una relación con la cantidad de trabajo realizado, influyendo el tipo de ejercicio sobre el incremento de la FC. Existe un mayor aumento en ejercicios de velocidad (carreras) y menor en los de fuerza (lanzamientos), siendo en los ejercicios de resistencia (carreras de fondo) la FC es intermedia.

#### D. Adaptaciones respiratorias.

##### - Consumo de O<sub>2</sub> y ventilación pulmonar.

El consumo normal de oxígeno para varón adulto joven en reposo es de 250 ml/min., pero en condiciones extremas este valor puede llegar a 3.600 ml/min. sin entrenamiento, 4.000 ml/min con entrenamiento deportivo y 5.100 ml/min. en un corredor de maratón masculino. El consumo de oxígeno y la ventilación pulmonar total aumenta unas 20 veces desde el estado de reposo al de ejercicio de intensidad máxima. La capacidad respiratoria máxima es cerca del 50 % mayor que la ventilación pulmonar real durante el ejercicio máximo, lo que ofrece un elemento de seguridad para los deportistas dándoles ventilación adicional en casos de ejercicios a grandes alturas, ambientes muy cálidos o anormalidades en el aparato respiratorio.

##### -Efecto del entrenamiento sobre la VO<sub>2</sub> máx.

El consumo de O<sub>2</sub> bajo un metabolismo aeróbico máximo (VO<sub>2</sub>máx) en periodos de entrenamiento cortos (2-3 meses) sólo aumenta el 10 %. Sin embargo, los corredores de maratón presentan un VO<sub>2</sub> máx. alrededor del 45 % superior al de las personas no entrenadas. En el ejercicio máximo se incrementa al triple (64 ml/min.) la capacidad de difusión con respecto al estado de reposo (23 ml/min).

#### E. Adaptaciones en sangre.

##### -Los efectos del ejercicio sobre los eritrocitos.

El recuento de glóbulos rojos de la sangre con frecuencia está aumentado en los primeros momentos del ejercicio, probablemente por simple hemoconcentración (transferencia de líquido sanguíneo a los tejidos). Durante ejercicios prolongados el líquido pasa a la sangre por lo que hay hemodilución y un esfuerzo muy agotador puede

causar incremento de la destrucción de los glóbulos rojos como consecuencia de compresiones capilares por la contracción muscular y el aumento del flujo sanguíneo, sobre todo en los individuos sedentarios que practican esporádicamente actividades físicas.

-Modificaciones de los glóbulos blancos durante el ejercicio.

El ejercicio incrementa el recuento leucocitario ya que en los primeros momentos del ejercicio intenso el aumento relativo de los leucocitos se debe sobre todo al mayor número de linfocitos, pero si el ejercicio se prolonga la elevación depende casi exclusivamente del aumento de neutrófilos. Este aumento se produce muy rápidamente y se han registrado cifras de  $35.000/\text{mm}^3$ . Esto es debido a que un gran número de células que durante el reposo permanecen adheridas a las paredes de los vasos son arrastradas a la circulación por el aumento del volumen y la velocidad del flujo sanguíneo. Cuando mayor es el grado de estrés asociado con el ejercicio, mayor es la elevación de leucocitos. El ejercicio extenuante determina mayor secreción de hormonas de la corteza suprarrenal y uno de los efectos causados por éstas es la disminución de los eosinófilos sanguíneos.

-Coagulación de la sangre y fibrinólisis.

El ejercicio acentúa la coagulación de la sangre y hay un aumento de la actividad fibrinolítica. Inmediatamente después del ejercicio se acorta el tiempo de coagulación, pero se normaliza a las pocas horas.

#### F. Adaptaciones en el medio interno.

El agua corporal total está determinada por un equilibrio entre los ingresos y las pérdidas hídricas.

Durante el ejercicio se produce una hemoconcentración, es decir, una mayor concentración de hematíes, hemoglobina y proteínas plasmáticas.

El mecanismo básico consiste en el paso de líquido desde la sangre hacia los espacios místicos por el aumento de la presión sanguínea de los capilares musculares y a un incremento de la presión sistólica durante el ejercicio a lo que se suma una transpiración excesiva. Durante el ejercicio prolongado en tiempo caluroso hay que beber agua con frecuencia para reponer líquido corporal que se pierde con la transpiración, pero el cuerpo no retiene el agua si ésta no se acompaña de sal.

El flujo sanguíneo renal suele ser menor durante el ejercicio y hasta una hora después de

realizado, y la magnitud de esa disminución se relaciona con la intensidad del ejercicio y con el grado de agotamiento producido.

Durante el ejercicio la excreción renal de agua disminuye, debido a que la secreción de ADH aumenta, al principio como consecuencia del estrés y de estímulos emocionales, y más adelante por la deshidratación que puede causar la transpiración intensa. Los riñones tienen un papel importante en la eliminación del ácido (lactato y piruvato) producidos en exceso durante el ejercicio vigoroso. Esto se demuestra midiendo el pH de la orina que desciende durante el ejercicio intenso.

### **1.1.3. Efectos beneficiosos del ejercicio físico.**

El cuerpo humano requiere para mantenerse funcionalmente activo realizar ejercicio físico de forma regular. A lo largo de la vida se van reduciendo normalmente las oportunidades de realizar ejercicio físico conforme nos hacemos adultos y tendemos a disminuir la actividad física, lo que supone un deterioro de la capacidad funcional en las personas inactivas ya que el ejercicio físico es fundamental para un mantenimiento óptimo del sistema cardiovascular y muscular. Es importante comprender los mecanismos por los que el ejercicio puede mejorar la salud, la capacidad funcional y la calidad de vida. Precisamente, uno de los objetivos de las sociedades desarrolladas sea la mejora de la calidad de vida de la población en todos los aspectos. Para ello, los individuos necesitan aumentar la práctica del ejercicio físico con el fin de conseguir el propósito anteriormente señalado ya que se dispone de datos que avalan su promoción generalizada como una medida efectiva, segura y práctica para la mejora de la salud y prevención de enfermedades.

Sin embargo, en las sociedades desarrolladas resulta paradójico que a pesar de la mejora progresiva en la salud pública prevalece un estilo de vida sedentario debido al desarrollo tecnológico que conlleva a un incremento de las patologías crónicas degenerativas, causado entre otros factores por una disminución de la actividad física diaria.(Molina, E., 2002).

Hay que tener en cuenta que es preciso para obtener los beneficios asociados al ejercicio físico realizarlo con una intensidad adecuada en cada caso necesitándose una

planificación, frecuencia, duración y tipología correctas, teniendo en cuenta la edad de la persona además de otras características individuales. De no ser así, en una preparación excesiva se puede ocasionar manifestaciones adversas fisiológicas o lesiones médicas que conducen a una situación de fatiga crónica y al síndrome del sobreentrenamiento. (Córdova, A., 2000).

Un trabajo sedentario o uno de continuo esfuerzo físico no es beneficioso para la salud sino que habrá que desarrollar una actividad física complementaria en cada caso que permita potenciar la calidad de vida para poder ejercer correctamente la actividad laboral evitando numerosas patologías.

No es lo mismo la actividad física y el ejercicio físico aunque se suelen emplear como términos sinónimos cotidianamente, como se refleja en la literatura científica:

- Actividad física es el “movimiento del cuerpo humano producido por la contracción muscular que genera un gasto energético por encima del nivel metabólico de reposo. Entonces el ejercicio físico será una forma de actividad física, y ésta podrá ser laboral o referirse a actividades realizadas en el hogar, actividades de tiempo libre, transporte, entrenamiento, deportivas...” según (López LM., Lucía A., 2002).
- Ejercicio físico siguiendo a los mismos autores, es el “movimiento corporal planificado, estructurado y repetido, realizado para aumentar o mantener uno o más componentes de la forma física”.

El objetivo de la OMS en su informe “Salud para todos” en el año 2000 era “incrementar hasta el 30% la proporción de personas de 6 o más años que realizan de forma regular, actividad física ligera o moderada durante al menos 30 minutos al día”. El objetivo no se cumplió (Esteban Fernández, E., 2004).

La inactividad física conlleva una serie de gastos económicos y sanitarios. El programa diseñado por la O.M.S. denominado *The Global Burden of Disease Study* afirma que el sedentarismo es uno de los hábitos perjudiciales que amenazan a la salud (Erikssen, G., 2001).

Los efectos de la inactividad física sobre la salud son muy parecidos a los que

origina la obesidad: una mayor mortalidad total, mayor morbilidad para enfermedades cardiovasculares (estos datos los avalan estudios epidemiológicos de los últimos 50 años, siendo la principal causa de muerte en E.E.U.U (45,20%) y otros países.), para accidentes cerebro-vasculares, para el cáncer de colon, para la diabetes de tipo 2, para la hipertensión y para las hiperlipemias. (*Pi-Sunyer, FX., 1999; Seidell, JC., et al, 1999*).

Si a la inactividad física se une el consumo de tabaco aumentan las enfermedades infecciosas en las mujeres mayores (*Leveille, SG., et al, 2000*).

Por tanto, es recomendable la práctica del ejercicio para mejorar el estado de salud de las personas mayores a la vez que se disminuirían los costes sanitarios. (*Stearns, SC., et al, 2001*).

◆ **Los efectos favorables del ejercicio** son numerosos e importantes como enumero continuación (*López, LM., 2002*):

- Disminuye la grasa corporal y aumenta la masa magra, aumentando la fuerza y resistencia de los músculos y el contenido mineral del hueso.
- Disminuye el LDL-colesterol y aumenta el HDL-colesterol, previniendo la aterosclerosis.
- Mejora la capacidad aerobia y es útil en la prevención y rehabilitación de las patologías cardiovasculares, metabólicas y degenerativas del aparato locomotor.
- Efectos cardiovasculares: descenso FC en reposo, aumento del volumen latido y VO<sub>2</sub> máx.
- Disminuye las cifras de presión arterial.
- Previene contra la litiasis biliar.
- Aumenta la sensibilidad a la insulina y mejora la diabetes.
- Mejora la función inmunitaria.
- Ejerce un efecto protector frente a algunos tipos de cáncer.
- Previene contra el estrés, la depresión, la ansiedad y mejora la autoestima ya que mejora el aspecto físico, a la vez que facilita el descanso nocturno.
- Mantiene el equilibrio psicológico y afectivo.
- Es útil en la lucha contra las adicciones o hábitos tóxicos.
- Influye en la duración y calidad de vida
- Mejora la condición física general y durante el embarazo y el envejecimiento en

particular.

Un paso significativo en los últimos años ha sido el creciente interés dentro del ámbito de la psicología por el estudio de los efectos del ejercicio físico sobre la salud mental. Existen varios mecanismos posibles a través de los cuales un individuo puede beneficiarse psicológicamente del ejercicio. Los estudios incluyen investigaciones psicofisiológicas, como por ejemplo, la relajación muscular, efectos termogénicos y cambios en las ondas cerebrales (*Hartfield, DB., Landers, DM., 1997*); psicobioquímicas, como el estudio de los niveles de catecolaminas y la liberación de opiáceos endógenos, (*Harbor, V.J., Sutton J.R., 1994*) y explicaciones desde el punto de vista de la psicología social sobre la mejora de la autoestima y la percepción de la eficacia. Así en la siguiente tabla se muestran las ventajas del ejercicio físico sobre la salud mental (*De Vries, H.A., 1987*):

<i>MEJORA</i>	<i>DISMINUYE</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• El rendimiento laboral y académico.</li> <li>• La asertividad.</li> <li>• El equilibrio emocional.</li> <li>• La memoria.</li> <li>• Mejora el estado de ánimo.</li> <li>• La capacidad de autocontrol.</li> <li>• La capacidad perceptiva.</li> <li>• La sociabilidad.</li> <li>• La autoimagen corporal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los trastornos del sueño.</li> <li>• La depresión.</li> <li>• La ansiedad.</li> <li>• Las fobias.</li> <li>• Las conductas tipo “patrón A”.</li> <li>• La activación fisiológica.</li> <li>• Los dolores de cabeza.</li> <li>• La agresividad, irritabilidad y sentimientos de ira.</li> <li>• El abuso de sustancias tóxicas.</li> </ul>

**Tabla I.1. En esta tabla se muestran los cambios positivos que produce el ejercicio físico sobre la salud mental.**

En cuanto a la relación entre el ejercicio físico y el envejecimiento se desconoce actualmente si gran parte del deterioro de la función mitocondrial que acompaña al envejecimiento es consecuencia del propio proceso involutivo o por el contrario se debe a una paulatina disminución de la actividad física en las personas mayores. En estos individuos sin experiencia deportiva, el entrenamiento aerobio realizado durante algunas

semanas hace que aumente la actividad de las enzimas mitocondriales y la producción de ATP en los miocitos (Lim, S., et al, 2000).

El ejercicio aerobio y el que se produce de manera extenuante requiere un gran consumo de oxígeno, lo que aumenta la producción de EROs responsables de alteraciones intracelulares, y sobre todo las que afectan a las mitocondrias. Las EROs disminuyen los sistemas defensivos celulares ya que reducen los depósitos de vitaminas antioxidantes y del glutatión. Sin embargo, los antioxidantes enzimáticos como los no enzimáticos son capaces de adaptarse a los efectos del ejercicio, sea agudo o crónico.

Se ha demostrado que el ejercicio, en dependencia de su intensidad, frecuencia y duración aumenta el número de las mitocondrias musculares así como su contenido, ya que se incrementa su volumen y la actividad de las enzimas mitocondriales, lo que supone que aumenta la síntesis de ATP por gramo de músculo. Uno de los objetivos de la biogénesis mitocondrial asociada al ejercicio es la de disminuir las alteraciones causadas por éste cuando se eleva progresivamente.

## **1.2. Ejercicio físico y sistema inmunitario.**

El sistema inmune es un complejo sistema integrado por un conjunto de células y moléculas para la defensa de nuestro organismo. La característica principal de éste es la capacidad de reconocer específicamente antígenos y desarrollar una respuesta efectora frente a ellos, provocando su destrucción o anulación funcional. Por tanto, es un eficaz sistema de defensa frente a potenciales microorganismos o agentes extraños que penetren en el cuerpo, o bien frente a transformaciones de células en tumorales. La clave del sistema inmune está en el reconocimiento de lo propio frente a lo extraño. El sistema inmune nos define y nos defiende, así hace posible la vida. Su fracaso conlleva la enfermedad, incluso la muerte. La eficacia de esta respuesta se fundamenta en la activación de células efectoras, que incluyen a los linfocitos y a las presentadoras de antígeno o accesorias, y también en la producción de anticuerpos (Prieto, A., et al, 1997). Sin embargo, la inadecuada generación de esta respuesta puede producir efectos letales en el propio huésped, provocando reacciones inflamatorias y daño tisular (Prieto, A., et al, 1997b).

En la actualidad se ha asumido que el sistema inmunitario es un excelente indicador del estado de salud del individuo y de su longevidad (Wayne, S.J., et al, 1990).



El ejercicio físico influye en los componentes celulares y moleculares del SI. Para poder comprender cómo el ejercicio puede influir en el sistema inmunitario hay que tener presente el funcionamiento de este sistema en el organismo, sabiendo que la clave del sistema inmunitario está en el reconocimiento de lo propio de lo extraño con la finalidad de eliminar esto último para mantener así la homeostasis. El S.I está constituido por una variedad de células con múltiples y complejas formas de comunicación. Todo el conjunto de mecanismos que utilizan estas células para llevar a cabo su función se denomina “respuesta inmunitaria”. El SI se divide en innato o inespecífico, en el que intervienen fagocitos, células NK y factores solubles y adquirido o específico en el que actúan los linfocitos.

El SI no funciona aislado sino que lo hace en conexión con los otros sistemas reguladores del organismo: el sistema nervioso (SN) y el sistema endocrino (SE). La comunicación bidireccional entre los sistemas reguladores fue puesta de manifiesto por Besedovsky y cols siendo posteriormente confirmada. (*Downing, J., Miyan, J., 2000*). El S.I. recibe información de estímulos no cognoscitivos (infecciones, células tumorales o extrañas...) enviando dicha información a través de las citoquinas producidas al sistema neuroendocrino (S.N.E), que a su vez capta estímulos cognoscitivos (luz, sonido, etc...) a los que responde, y sus mediadores que son los neurotransmisores y las hormonas llegan al SI informándole de la situación. Por tanto, podemos decir que existe un sistema neuroinmunoendocrino que permite el mantenimiento de la homeostasis corporal.

El ejercicio físico incide en la homeostasis corporal, en los sistemas fisiológicos y en su regulación. Podemos considerar que ***los aspectos fisiológicos que se ven afectados en la realización del ejercicio físico son:***

- Función muscular.
- Metabolismo celular.
- Nutrición.
- Sistema cardiovascular.
- Sistema respiratorio.
- Sistema neuroendocrino.
- Sistema inmunitario.

- Aspectos psicológicos.

*Los efectos del ejercicio físico en el sistema inmunitario* van a ser complejos y variados al considerar la complejidad del sistema inmunitario como del proceso del ejercicio. (De la Fuente M, 2002). Las consecuencias del ejercicio en el sistema inmunitario dependerán de:

- ◆ tipo, intensidad y duración de la actividad física realizada.
- ◆ el estado previo del individuo (no es lo mismo una persona sedentaria que un deportista habitual).
- ◆ el momento de la valoración inmunitaria (inmediatamente tras la finalización de una actividad física o transcurrido un tiempo después de haber finalizado la misma).
- ◆ el estrés que suponga a cada persona la realización de la actividad física. Esto adquiere especial relevancia ya que el ejercicio físico es un modelo de estrés clásicamente establecido (Salit, M., 2003).

Por ello, durante el ejercicio físico puede darse la estimulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, con la producción de ACTH y glucocorticoides, así como la estimulación del S.N.S y el aumento de catecolaminas, lo que va a influir de forma clara en el sistema inmunitario. Por tanto, hay que diferenciar el efecto del estrés que produce el ejercicio sobre el sistema inmunitario del efecto del ejercicio en el organismo sin considerar el estrés. (Maya, A., et al, 1998).

La existencia de una relación entre el ejercicio y el sistema inmune se ha comprobado científicamente por Eberhardt (1.973) en un estudio donde puso de manifiesto que un ejercicio físico intenso conduce a cambios funcionales del organismo, entre los que pueden destacarse los cambios que experimentan los mecanismos inmunológicos.

Posteriormente (Fitzgerald, L., 1999), realiza una publicación en la que se afirma que: "El ejercicio intenso y de larga duración puede causar deficiencia inmunológica, mientras que el ejercicio moderado y con entrenamiento mejora la función inmunitaria". Era un hecho conocido que los deportistas de competición son más susceptibles a las infecciones y a una mayor gravedad de ciertas enfermedades relacionadas con el sistema inmune. Los efectos de una actividad física moderada son menos conocidos, pero

parecen ser beneficiosos para el sistema inmune. (Marcos Becerro, JF., De la Fuente, M., 2000).

Sin embargo, en la década de los 90 todavía no se tiene claro ni se saben con exactitud los mecanismos del efecto que el ejercicio, en sus diferentes características tiene en la función inmunitaria, lo que reseña Simon (1.991): "No hay evidencia de que la actividad física altere la susceptibilidad a la infección".

### 1.2.1. El efecto del ejercicio físico en las células inmunitarias.

Existen estudios que han demostrado que la práctica de ejercicio moderado puede estimular la eficacia del sistema inmunitario, mientras que el estrés originado por el entrenamiento excesivo y prolongado en el tiempo en atletas puede alterar su función. (Córdova, A., 1997). Los deportistas profesionales están sometidos a una gran tensión y esfuerzo tanto físico como mental, lo que podría suele causar cambios neuroendocrinos y cardiovasculares que contribuyen a alteraciones del sistema inmune (Reighlin, S., 1993; Laperriere, A., et al, 1994).

La realización de un ejercicio físico intenso provoca un incremento en la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que contribuyen ampliamente a modificar parámetros de la respuesta inmunológica (Laperriere, A., et al., 1994). Las catecolaminas tienen su papel en la modulación inmune tras el ejercicio ya que provocan leucocitosis y linfocitosis, afectando también a la distribución y función de sus respectivas poblaciones celulares (Keats, D., et al, 1988). Podemos decir que el efecto general de la acción de la descarga de catecolaminas como respuesta al estímulo provocado por la práctica de ejercicio físico es un efecto inmunosupresor (Keats, D., et al, 1988). Además, se produce simultáneamente una descarga de corticoesteroides que a su vez provocan una respuesta de inmunosupresión. Los corticoesteroides producen un descenso en la proliferación de linfocitos, un descenso en producción de interleuquina-2 (IL-2) y una disminución de la expresión de receptores para IL-2. Por tanto, el ejercicio físico intenso provoca desencadenamiento de una respuesta inflamatoria, lo que a su vez estimula la secreción adrenocortical y a su vez produce la activación de las células inmunes (Keats, D., et al, 1988; Mazzeo, RS., 1994).

La respuesta se refleja en modificaciones bioquímicas, endocrinas, hematológicas,

fisiológicas, etc. que pretenden llevar al organismo a su situación homeostática favorable. Los cambios en la respuesta inmunológica se pueden acompañar de alteraciones generales y tisulares locales que cursan con patología inflamatoria (Sigal, LH., Ron, Y., et al, 1994; Laperriere, A., et al, 1994).

Se realizaron en primer lugar estudios sobre los cambios cuantitativos de las células inmunocompetentes tras realizar actividad física. Hay diversos estudios publicados que constatan que tras la realización del ejercicio físico se produce una leucocitosis, aumentando unas subpoblaciones celulares y disminuyendo otras, aunque hay que destacar que no existe un acuerdo unánime al respecto (Cannon, JG., 1993), (Pedersen, BK., Hoffman-Goetz, L., 2000). Parece demostrado que la leucocitosis es proporcional a la concentración plasmática de las catecolaminas, que aumentan con la intensidad y duración del ejercicio físico (Laperriere, A., et al, 1994). La proliferación de linfocitos está causada por la secreción de citoquinas que se producen como consecuencia de la hipertermia en el ejercicio.

Se ha tardado más tiempo en obtener una exhaustiva información sobre los cambios que suceden en la función de las células de sistema inmune con el ejercicio. Se ha realizado un estudio con el objetivo de observar las variaciones que experimenta la funcionalidad de las células inmunitarias (linfocitos, fagocitos y células NK) en personas y animales de experimentación que se someten a diversas modalidades y programas de ejercicio.

En humanos se estudió la función inmunológica en grupos de deportistas de élite (ciclistas, atletas, piragüistas, judocas y baloncestistas) como grupo sometido a un sobreentrenamiento, un segundo grupo formado por estudiantes del INEF como grupo con entrenamiento pero moderado y un tercer grupo de sedentarios a los que se somete a ejercicios puntuales. (Fernández, MD., et al, 1996).

En los animales de experimentación se utilizaron ratas, ratones y cobayas a los que sometieron a ejercicio físico (carrera en tapiz rodante y natación), analizando los efectos de estos ejercicios tanto de forma esporádica como en diferentes programas de entrenamiento. Se observaron también en cada grupo experimental las diferencias en cuanto a sexo.

En cada una de las células inmunitarias estudiadas se estudiaron sus funciones más representativas:

- a. En los linfocitos (de distintos órganos inmunocompetentes en los animales y de sangre humana), su capacidad de adherencia a los endotelios vasculares y su movilidad hasta llegar al determinante antigénico, así como su proliferación. Se observó que únicamente un entrenamiento moderado aumenta la actividad de los mismos, mientras que tanto los ejercicios agudos como el sobreesfuerzo la inhiben.
- b. En los fagocitos (macrófagos peritoneales de animales de experimentación y neutrófilos circulantes en los humanos) la adherencia a tejidos, la movilidad hacia el foco infeccioso o quimiotaxis, la ingestión de material extraño, y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) para destruir el material ingerido, siendo el anión superóxido el primer radical libre que producen los fagocitos. Únicamente algunos ejercicios agudos y estresantes disminuyen su funcionalidad mientras que otros ejercicios agudos y el entrenamiento la aumentan. Un sobreentrenamiento tanto en los deportistas de élite como en los animales de experimentación consigue disminuirla.
- c. En las células NK se analizaba su capacidad de lisis frente a células tumorales. El entrenamiento mejora dicha función mientras que los ejercicios agudos no la afectan o la disminuyen.

En conclusión, en relación al efecto del ejercicio físico en el sistema inmune podemos afirmar que un ejercicio intenso y prolongado es perjudicial mientras que el moderado no influye o es beneficioso, teniendo en cuenta el estado fisiológico del individuo, así como si es sedentario o es deportista habitual. Por ello, los estudiantes de INEF tenían una función inmune mejor que los sedentarios, mientras que los deportistas de alta competición presentaban una inmunodepresión. Los ejercicios puntuales realizados por sedentarios disminuyen la función inmunitaria.

Tras la realización de actividad física la  $\beta$ -endorfina parece ser la que mejor se relaciona con la mejoría inmunitaria que se manifiesta con el ejercicio físico moderado. Hay una mejor respuesta a los efectos positivos del ejercicio en las hembras y en las

mujeres que en los machos y en los hombres. (Ortega, E., 1991; Ferrández, MD., 1994; Ferrández, MD., De la Fuente, M., 1995).

### 1.2.2. Ejercicio físico y sistema inmunitario en el envejecimiento.

Para entender las ventajas que tiene la actividad física en el proceso de envejecimiento hay que buscar las causas de este proceso y en particular cómo lo hace el sistema inmune.

#### ■ El proceso de envejecimiento.

En el envejecimiento se producen una serie de alteraciones funcionales debido a una variación en la homeostasis corporal, pudiéndose desencadenar distintas patologías. Es de destacar que de las más de 300 teorías que según Medvedev (Medvedev, Z., 1990) se han enunciado sobre el proceso de envejecimiento, la de los “radicales libres”, propuesta por Harman en 1956 (Harman, D., 1956) y desarrollada posteriormente por él mismo (Harman, D., 1986) y otros investigadores como Miquel (Miquel, J., 1998; Miquel, J., et al, 1980), es probablemente la más aceptada. Los radicales libres (RL) de oxígeno que se originan en nuestras células como consecuencia de la utilización del oxígeno para la respiración celular, son altamente reactivos y por ello son capaces de dañar todos los tipos de biomoléculas (proteínas, lípidos y material genético) en las células. El orgánulo celular más afectado es la mitocondria, ya que en ella se lleva a cabo la respiración celular. Parece cada vez más confirmado que el daño mitocondrial producido por los RL origina una pérdida de capacidad energética en las células que conduce al envejecimiento y necrosis celular y a largo plazo a la muerte del individuo (Miquel, J., et al, 1980).

Las células han desarrollado defensas antioxidantes cuya acción es impedir la formación de RL o neutralizar a los mismos una vez generados, pero estos sistemas aunque protectores no son perfectos y cuando la producción de ROS es muy elevada superando a las defensas antioxidantes se produce un estrés oxidativo con el resultado de daño celular (Sies, H., 1996).

El oxígeno es imprescindible para la vida y las ROS, en determinadas cantidades,

son necesarias para muchos procesos fisiológicos fundamentales para la supervivencia del organismo (Knight, JA., 2000), (Cascales, M., 1999). Por tanto, el buen funcionamiento del organismo depende de un perfecto equilibrio entre los niveles de prooxidantes y de antioxidantes. Si se produce un exceso de oxidantes o un déficit de antioxidantes rompiéndose el equilibrio se produce un estrés oxidativo que conlleva al envejecimiento. (Sastre, J., et al, 2000).

### ■ Influencia del ejercicio físico en el sistema inmune en el envejecimiento.

La práctica de ejercicio físico moderado mejora la función inmunitaria en la vejez como se muestra en diversos estudios realizados y se resume en la siguiente tabla:

CÉLULAS	FUNCIÓN	EJERCICIO EN VEJEZ
1. Fagocitos	Adherencia	Disminuye (=adulto)
	Migración	Aumenta(=adulto)
	Fagocitosis	Aumenta(=adulto)
	Producción de ROS	Disminuye (=adulto)
	Producción de TNF $\alpha$	Disminuye (=adulto)
2. Linfocitos	Adherencia	Disminuye (=adulto)
	Migración	No afecta (=adulto)
	Proliferación	Aumenta(=adulto)
	Producción de IL-2	Aumenta(=adulto)
3. Células NK	Citotoxicidad	Aumenta(=adulto)

**Tabla I.2. Cambios del adulto-joven al mayor en diferentes funciones de las células inmunitarias. Papel del ejercicio físico moderado.**

### ■ Cambios en el sistema inmunitario con la edad.

La inmunosenescencia es el deterioro del sistema inmune con el envejecimiento y es crucial en la morbilidad y mortalidad que se produce en esta etapa de la vida (Wayne, SJ., et al, 1990), como demuestra el aumento en la incidencia y prevalencia de patologías como las autoinmunes, infecciones y tumores lo que evidencia que el sistema inmune es mucho menos eficiente.

La “teoría inmunitaria” propone que los cambios que acontecen en el envejecimiento se deben en última instancia a las alteraciones que se producen en la inmunidad (Makinodan, T., Kay, M., 1980; Walford, RL., 1997). No se conoce exactamente lo que sucede en el sistema inmunitario al envejecer debido a lo complejo del proceso de envejecimiento, a las características intrínsecas del sistema inmune y a su interacción con los demás procesos fisiológicos del organismo. Así, encontramos bastantes controversias sobre las modificaciones que experimenta la respuesta inmunitaria en el envejecimiento, ya que hay células inmunitarias que modifican su capacidad funcional al envejecer pero no todas manifiestan un claro deterioro, incluso algunas parece que se encuentran más activadas y otras no experimentan cambios, como por ejemplo le sucede a los leucocitos de los órganos inmunocompetentes y a los de la sangre periférica.

Además, hay que tener en cuenta que los factores nutricionales, psicológicos y ambientales influyen en la función del sistema inmune, así como la diversidad interindividual y la elección de edades en las que se efectúan los estudios, que son casi siempre de tipo transversal. Lo ideal sería realizar estudios longitudinales muy bien estandarizados para conocer cómo se produce la inmunosenescencia. Por tanto, los cambios estructurales y funcionales que aparecen en el sistema inmunitario pueden deberse a una reestructuración que afecta a cada componente del sistema y a las influencias recíprocas entre los mismos (De la Fuente, M., 1998; Pawelek, G., et al, 1999; Ortega E, et al, 2000; Lord, JM., et al, 2001).

A pesar de las discrepancias existe cierta unanimidad al afirmar que las células T son las más afectadas en el envejecimiento tanto a nivel estructural como funcional frente a infecciones y tumores. Se ha comprobado tanto *in vivo* como *in vitro* y con especies con distinta esperanza de vida, que los cambios que se observan en otras células inmunitarias como los linfocitos B son debidos a las alteraciones de las células T.

En concreto, con el envejecimiento disminuye tanto la capacidad proliferativa de los linfocitos T a los antígenos y la producción de citoquinas reguladoras de funciones linfoide como la IL-2 y el interferón gamma o la actividad citotóxica frente a células infectadas. Se ha postulado que los cambios en la funcionalidad en las células



inmunitarias en el envejecimiento se deben, en parte, a las alteraciones en los perfiles de citoquinas que producen los linfocitos (*Pawelek, G., et al, 1999; Globerson, A. et al, 2000*). Hoy en día, se piensa que el deterioro de la inmunidad dependiente de las células T durante el envejecimiento es multifactorial. Los factores que contribuyen a la inmunosenescencia de los linfocitos T son los siguientes sin precisar aún cuáles tienen una mayor importancia en el proceso:

1. Con el envejecimiento hay una menor respuesta hematopoyética que puede deberse a fallos en las células madre o a las citoquinas reguladoras.
2. Una disminución en la formación de células T maduras que puede deberse a una atrofia que sufre el timo con la edad.
3. Los cambios numéricos en las subpoblaciones linfoides, como el descenso de los CD4 frente al aumento de los CD8, o la de los linfocitos T vírgenes (CD45RA+) frente a los T memoria (CD45RO+), que aumentan. Durante el envejecimiento se aprecia una menor actividad de los linfocitos productores de citoquinas relacionadas con la inmunidad celular, como la IL-2 y el IFN $\gamma$ , y mayor de los linfocitos que producen citoquinas implicadas en la inmunidad humoral que llevan a cabo los linfocitos B, como la IL-4, IL-5 o IL-3. Sin embargo, estos cambios no coinciden en todas las investigaciones (*Pawelek, G., et al, 1999*), (*Globerson, A., Effros, R.B, 2000*).
4. Al envejecer los linfocitos se produce una modificación funcional debido a los cambios que se producen a nivel de segundos mensajeros por lo que se alteran las vías intracelulares de señalización (34). Estos cambios pueden incluir menores niveles de inositol trifosfato (IP3) y diacil glicerol (DAG), diferencias en las isoformas de la fosfolipasa C (PLC) y de la protein quinasa C (PKC), menor fosforilación de ZAP-70, y en general un alterado funcionamiento de quinasas (MAPK, ERK, JNK, etc).
5. Las anomalías en la expresión de moléculas coestimuladoras o de sus receptores pueden ser importantes responsables del deterioro funcional de las células T en el

envejecimiento, como sucede con la familia de correceptores CD 28 que disminuyen con la edad y son necesarios para la adecuada activación de los linfocitos T.

En cuanto a las células NK, a pesar de que su número parece aumentar con la edad su actividad lítica frente a células tumorales se encuentra deteriorada, lo que explicaría la mayor incidencia de tumores con el envejecimiento (*Pawelek, G., et al, 1999*), (*Medina, S., et al, 1998*), (*Ferrandez, M.D., et al, 1999*).

En los fagocitos es donde se dan las mayores controversias en cuanto a los resultados encontrados, ya que aunque ciertas funciones de estas células descienden en la vejez, como su capacidad presentadora, otras se encuentran aumentadas, como sucede con la producción del factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), su capacidad de adherencia o la producción y liberación de ROS y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) (*Ortega, E., et al, 2000*), (*De la Fuente, M., 2001*)( *Guayervas, N., et al, 2002*), (*Guayervas N, et al, 2002b*). Esto ha llevado a algunos investigadores ha asegurar que los fagocitos funcionan aceptablemente durante el envejecimiento y que sus cambios están condicionados a las alteraciones que sufren los linfocitos (*Lord, JM., 2001*).

Hay que tener en cuenta que aunque los estudios realizados *in vitro* con poblaciones o subpoblaciones celulares aisladas tienen un alto interés al proporcionar información sobre los cambios del sistema inmune al envejecer, en el organismo las células no están aisladas y que las alteraciones que tienen lugar en otras células influyen en las células que estamos estudiando.

Por ello, se ha llevado a cabo un estudio en el que se analizan los cambios que tienen lugar con la edad en las diferentes funciones de los tres tipos de células inmunes más representativas, (fagocitos como los macrófagos peritoneales de ratones y neutrófilos de sangre periférica humana, linfocitos y células NK) tanto en animales de experimentación (ratones) y como en el ser humano cuyos resultados se resumen en la siguiente tabla:

CÉLULA	FUNCIÓN	ENVEJECIMIENTO
1. Fagocitos.	Adherencia	Aumenta
	Migración (quimiotaxis)	Disminuye
	Fagocitosis	Disminuye
	Producción ROS	Aumenta
	Producción de RNS	Aumenta
2. Linfocitos.	Producción TNF $\alpha$	Aumenta
	Adherencia	Aumenta
	Migración	Disminuye
	Proliferación	Disminuye
3. Células NK.	Producción de IL-2	Disminuye
	Citotoxicidad	Disminuye

**Tabla I. 3. Cambios del adulto joven al mayor en las diferentes funciones de las células inmunitarias.**

Aunque se ha afirmado que las comparaciones en la inmunosenescencia entre ratones y humanos es difícil ya que se distinguen en muchos aspectos fisiológicos, tras el análisis de los resultados se evidencia que la evolución de las modificaciones que experimentan las funciones inmunitarias con la edad (meses en ratones y años en humanos) son iguales. Lo que si es diferente es la evolución de los cambios a lo largo de la vida de unas funciones a otras, como también se muestra en la tabla anterior. Así, por ejemplo hay funciones que aumentan progresivamente con la edad como la adherencia, la producción de TNF- $\alpha$  o de ROS, pero otras como la proliferación de linfocitos, la producción de IL-2 o la actividad NK aumentan en el adulto respecto del joven y posteriormente disminuyen en la vejez. Existen incluso funciones que van disminuyendo paulatinamente desde la juventud a la vejez como la quimiotaxis y la fagocitosis.

Como conclusión, se puede afirmar que con el paso del tiempo el sistema inmune cambia y se reestructura. Muchos de estos cambio pueden suponer procesos de adaptación para intentar mejorar la función inmunitaria, pero lo paradójico entonces es el porqué al envejecer se producen más infecciones y tumores. El hecho de que existan

más células memoria que vírgenes puede reflejar una mayor respuesta a numerosos antígenos con el paso de los años, pero también se puede interpretar como una compensación al reducido número de células vírgenes que se generan en el timo que se va atrofiando o también ser un reflejo de la diferente sensibilidad a la apoptosis.

Los cambios en el sistema inmune con la edad se manifiestan con una menor respuesta en aquellos aspectos que nos podrían resultar más beneficiosos, y por otra parte, con una exagerada respuesta de actividades que, aunque en principio tengan función defensiva, pueden resultar perjudiciales al producirse en abundancia. (*De la Fuente, M., 1998*), (*Pawelek, G., et al, 1999*), (*Lord, JM., et al, 2001*). Durante el envejecimiento, resultan aumentadas las funciones de la inmunidad más inespecífica, como la capacidad de adherencia a sustratos titulares, la producción de ROS, de RNS y citoquinas como el TNF $\alpha$ . Estas funciones activadas son precisamente las que más se relacionan con un estado de oxidación en el individuo (*Knight, JA., et al, 2000*; *Victor, MV., et al, 2002*).

Actualmente, las investigaciones se dirigen hacia la profundización del conocimiento de los mecanismos que producen inmunodepresión en la vejez y en descubrir agentes químicos o fisiológicos que logren una revitalización del sistema inmune en el envejecimiento para conseguir una mejor calidad de vida en la vejez. Por tanto, los antioxidantes como agentes químicos podrían mejorar la función inmunitaria en el envejecimiento, y la práctica del ejercicio físico adecuado sería un aspecto fisiológico que permitiría mejorar la función inmunitaria en este período de la vida.

### ■ **Papel del sistema inmune en el envejecimiento.**

Los cambios en la función inmunitaria que ocurren con la edad pueden suponer un excelente marcador de la edad biológica del individuo y de su longevidad, de tal manera que muchas investigaciones se orientan a conocer cuáles son las causas de esos cambios que subyacen al deterioro inmune. Los resultados de las aún insuficientes investigaciones indican que la inmunosenescencia tiene lugar por los mismos motivos que producen el envejecimiento de todos los componentes celulares del organismo, y se deben a la oxidación por la necesaria utilización del oxígeno y la acción dañina de los radicales libres (*Gracy, RW., et al, 1999*).

El sistema inmune es un claro ejemplo de la necesidad de mantener el equilibrio oxidantes/antioxidantes para conservar un estado funcional adecuado. Para llevar a cabo sus funciones las células inmunitarias producen ROS, como por ejemplo los leucocitos activados (Pawelek G, et al, 1999), teniendo en cuenta que son especialmente sensibles a la oxidación debido al alto grado de ácidos grasos poliinsaturados de sus membranas, la señalización intracelular relacionada con esas membranas y la expresión genética que se necesita para el desempeño de su función defensiva. Por todo ello, en las células inmunitarias resultan crucial mantener dicho equilibrio ya que puede determinar su capacidad funcional (De la Fuente, M., 2002). Los cambios que se producen en la funcionalidad de las células inmunes con el envejecimiento se deben al estrés oxidativo crónico que experimentan las mismas con el paso del tiempo.

Las células inmunes en su tarea defensiva ejercen una respuesta inflamatoria, produciendo factores proinflamatorios como TNF $\alpha$ , ROS y RNS que permiten la inflamación y la eliminación de lo extraño. Estos factores proinflamatorios se encuentran aumentados al envejecer se está construyendo una nueva teoría del envejecimiento, la “teoría inflamatoria”. Se conoce que un factor de transcripción, el NF-kB, implicado en la expresión de genes de compuestos oxidantes e inflamatorios como el TNF $\alpha$ , las enzimas del tipo oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), productora del óxido nítrico y de RNS, o la ciclooxigenasa 2 (COX-2), productora de ROS, manifiesta una gran activación en las células inmunitarias en situaciones de estrés oxidativo (Knight JA., 2000; Cascales, M.,1999) como sucede con el envejecimiento (De la Fuente, M., 2002).

Podríamos considerar que el sistema inmune con el paso del tiempo se va enfrentando a agentes extraños lo que provoca que el equilibrio oxidantes/antioxidantes se incline a favor de los primeros ocasionando un estrés oxidativo crónico que se acentúa en las células inmunes por su producción de factores oxidantes e inflamatorios en su labor defensiva. Como consecuencia de ese daño oxidativo, se produciría un descenso en la capacidad reguladora de estas células sobre su propio equilibrio redox, lo que a su vez repercutiría en una señalización intracelular alterada (Pawelek, G., et al, 1999). En este sentido la comunicación entre los sistemas reguladores estaría deteriorada, es decir, existirían fallos en la comunicación neuroinmunoendocrina (Fabris N,1999) de lo que

existen evidencias experimentales que avalan esta idea de que al envejecer se modifica la respuesta del sistema nervioso, la del inmunitario y la del endocrino, así como la comunicación entre ellos (*De la Fuente, M., et al, 2001*); considerando al estrés oxidativo como causa de tal deterioro de los sistemas reguladores y de su comunicación que conduce a alteraciones homeostáticas que aumentan la morbilidad con el envejecimiento.

### **1.2.3. Efecto de los antioxidantes en el sistema inmunitario.**

Tanto una correcta nutrición como el adecuado ejercicio físico actuarían como revitalizadores de la función inmunitaria. La nutrición es, además un factor determinante de la capacidad inmunitaria (*Meydani, SN., Ericsson, KL., 2001*) ya que va a incidir de forma decisoria en el desarrollo y posterior funcionalidad de nuestro sistema defensivo incluso regulando la función del mismo. Todos los nutrientes son importantes pero hay algunos que resultan críticos para un mantenimiento óptimo de dicha función, como son los micronutrientes como el zinc, el selenio, las vitaminas C, E B6 y el ácido linoleico. La malnutrición puede conllevar a una inmunodeficiencia y la baja calidad de la dieta puede incidir negativamente en la respuesta inmunitaria (*De la Fuente M, 2002*). Podríamos establecer dos estrategias nutricionales para mantener en óptimo estado el funcionamiento del sistema inmunitario. Una sería la administración de mayores niveles de nutrientes antioxidantes muchos de los cuales tienen también carácter antiinflamatorio, para poder equilibrar el balance celular entre los niveles de oxidación e inflamación con los de las defensas antioxidantes.

La otra estrategia sería una menor producción de oxidación a través de la restricción calórica, que mejora la funcionalidad de las células inmunitarias. El papel que ejercería la restricción calórica parece llevarse a cabo a través de la modulación que sobre la expresión de una serie de genes siendo muchos de ellos los implicados en la expresión de los factores oxidantes/ antioxidantes (*Pahlavani, MA., 2000*). Se ha comprobado que la restricción calórica incide sobre factores de transcripción, reduciendo la activación que tiene lugar con la edad en factores como el NF-kB.

Los compuestos antioxidantes que presentan la capacidad de impedir la formación

de ROS, de neutralizarlas y por lo tanto de controlar la oxidación, pueden ser endógenos o exógenos. Los endógenos se encuentran en nuestro organismo para mantener la existencia de unos niveles de ROS necesarios para el funcionamiento corporal, evitando una superproducción o su acumulación y paralelamente los efectos patológicos que los ROS desencadenan (*De la Fuente, M., 2000*). Si se produce una disminución de los niveles de antioxidantes endógenos, lo que suele suceder por un gasto en la neutralización del exceso de ROS, los mismos se pueden incorporar a través de la dieta o mediante la suplementación de cantidades apropiadas de antioxidantes exógenos entre los que se encuentran ya una lista considerable de compuestos siendo los más conocidos la vitamina C, la E o los carotenos y otros como el ácido lipoico, los flavonoides y aquellos de tipo tiólico que aumentan los niveles intracelulares de glutathion reducido (GSH).

Numerosos estudios se han realizado para determinar si las defensas antioxidantes declinan con la edad y están basados en las mediciones de las enzimas y compuestos con funciones antioxidantes:

- ◆ Actividad o expresión de SOD. Las referencias sobre el comportamiento de la actividad de esta enzima durante el envejecimiento son contradictorias.
- ◆ Catalasa (CAT). En mamíferos, el comportamiento de esta enzima con la edad es diferente según el tejido, ya que disminuye en riñón e hígado y tiende a aumentar en corazón y cerebro, donde disminuye acusadamente en las últimas etapas de la vida.
- ◆ Glutathion peroxidasa (GPx). La actividad y expresión de GPx y glutathion-transferasa (GST) declinan durante el envejecimiento en todos los tejidos estudiados, a diferencia de la GRd que en mamíferos aumenta en cerebro y corazón pero disminuye en hígado y riñón.
- ◆ Glutathion reductasa (GRd).
- ◆ Concentración de glutathion reducido (GSH). Diferentes autores han demostrado que las concentraciones de GSH en varios tejidos de origen murino disminuyen significativamente con la edad, observándose resultados parecidos en insectos.
- ◆ Vitaminas
- ◆ Ácido úrico y otros.

Toda una serie de estudios han comprobado que los antioxidantes son necesarios y se emplean en llevar a cabo una correcta función del sistema defensivo. Durante su actividad, las células inmunitarias van consumiendo sus reservas de antioxidantes (Hernanz, A., et al, 1990).

Parece evidente que la suplementación con este tipo de compuestos podría tener un efecto beneficioso en la neutralización del estrés oxidativo alcanzándose el equilibrio oxidante/antioxidante perdido, si consideramos que al envejecer se producen mayores niveles de ROS junto a frecuentes estados de malnutrición y una disminución de las defensas antioxidantes (Sastre, J., et al, 2000; Meydani, SN., et al, 2001). Debido a esto se han realizado una serie de trabajos con la finalidad de comprobar si la administración de antioxidantes podría tener un efecto estimulador de la funcionalidad de nuestro sistema inmune durante la vejez, obteniéndose hasta el momento resultados muy prometedores ya que se evitarían muchas patologías derivadas del estrés oxidativo (De la Fuente, M., et al, 1998; Puerto, M., et al, 2002) como se muestra en la tabla adjunta:

Células	Función	Antioxidantes en vejez.
1. Fagocitos.	Adherencia	<b>Disminuye(=adulto)</b>
	Migración	<b>Aumenta(=adulto)</b>
	Fagocitosis	<b>Aumenta(=adulto)</b>
	Producción de ROS	<b>Disminuye(=adulto)</b>
	Producción de TNF $\alpha$	<b>Disminuye(=adulto)</b>
2. Linfocitos.	Adherencia	<b>Disminuye(=adulto)</b>
	Migración	<b>Aumenta(=adulto)</b>
	Proliferación	<b>Aumenta(=adulto)</b>
	Producción de IL-2	<b>Aumenta(=adulto)</b>
3. Células NK.	Citotoxicidad.	<b>Aumenta(=adulto)</b>

**Tabla I. 4. Cambios del adulto-joven al mayor en diferentes funciones de las células inmunitarias.**

**Papel de la ingestión de antioxidantes.**

Una de las observaciones que más avalan la teoría oxidativa del envejecimiento es la comprobación del incremento de la esperanza de vida de algunos animales de laboratorio tras la ingestión de ciertos antioxidantes en la dieta (Miquel, J., Economos, AC., 1989).



El efecto beneficioso de los antioxidantes es más manifiesto en las células inmunitarias de personas envejecidas, siendo necesario una mayor dosis de los mismos a medida que avanza la edad (De la Fuente, M., 2002). En la población española la ingestión de la vitamina C y la E mejoró significativamente la funcionalidad de las células inmunocompetentes en individuos mayores (De la Fuente, M., 2002), (De la Fuente, M., et al, 1998), (De la Fuente, M., Victor, VM., 2000). Lo que supone recuperar los niveles de función inmunitaria que presentan los adultos de 30 a 35 años, periodo con la respuesta inmunitaria más idónea, lo que se manifiesta con una estimulación de aquellas funciones que se encontraban deprimidas y con una disminución de las que estaban muy activadas.

La capacidad moduladora de los antioxidantes en la función inmunitaria es más evidente en aquellos individuos que la tienen más deteriorada, hecho que lo hemos comprobado tanto en humanos como en animales de experimentación. En ancianos con depresión o cardiopatías la suplementación con vitaminas antioxidantes resultó más efectiva mejorando su sistema inmunitario con respecto a los individuos sanos de su misma edad (De la Fuente, M., et al, 1998). En ratones, los antioxidantes tiólicos mejoraron la función inmunitaria en mayor medida en los que presentaban un envejecimiento prematuro (Puerto M., et al, 2002; Correa, R., 1999) y en los que tenían un proceso infeccioso por inyección con LPS (De la Fuente M, Victor VM., 2000; Victor, VM., et al, 1999) aumentando la supervivencia de los mismos.

La mejoría que ejercen los antioxidantes en la función inmunitaria supone aumentar las funciones que están disminuidas y reducir las que están muy estimuladas, pero resaltando que los antioxidantes no ejercen su acción indiscriminadamente sino que restauran los niveles más apropiados para cada función inmune en situaciones en las que se encuentran alteradas por un estrés oxidativo actuando por lo tanto como inmunomoduladores (De la Fuente M, Victor VM., 2000). Esta capacidad moduladora parece se ejercida a nivel de los factores intracelulares implicados en la oxidación e inflamación como el NF-kB (De la Fuente, M., 2002). El papel regulador afectaría no sólo al sistema inmunitario sino también a otros sistemas reguladores. De hecho, es ya claramente aceptado el papel de los antioxidantes como restauradores de un gran número de funciones nerviosas (Sastre, J., et al, 2000). Además en los ratones

prematuramente envejecidos la ingestión de antioxidantes mejora incluso la respuesta conductual, lo que indica que el estrés oxidativo que subyace al deterioro del sistema inmune y también al del sistema nervioso, se neutraliza con la administración de antioxidantes.

Por lo tanto, podríamos considerar a los antioxidantes como compuestos útiles para enlentecer o neutralizar el deterioro homeostático que tiene lugar durante el envejecimiento, disminuyendo la mortalidad y la morbilidad asociadas en ese periodo vital.

### **1.3. Ejercicio físico y antioxidantes.**

El ejercicio físico extenuante ocasiona estrés oxidativo, lo cual está ampliamente recogido en la bibliografía científica. Existen diversas fuentes de oxidantes durante el ejercicio físico como son la producción de anión superóxido por la mitocondria, el fenómeno de isquemia-reperfusión y la autooxidación de las catecolaminas.

El ejercicio muscular origina un incremento en la producción de radicales libres y otras formas de especies reactivas de oxígeno. Las células musculares contienen complejos mecanismos de defensa celulares para minimizar los riesgos del daño oxidativo. Los mecanismos endógenos protectores que actúan para reducir los efectos de los oxidantes en la célula son enzimáticos y no enzimáticos. Antioxidantes no enzimáticos importantes son la vitamina E y C, beta-caroteno, GSH, ácido úrico, ubiquinona y bilirrubina. La vitamina E, beta-caroteno y ubiquinona están localizados en regiones lipídicas de la célula, mientras que el ácido úrico, GSH y la bilirrubina están en compartimentos acuosos celulares. Numerosos estudios han demostrado que la adición de antioxidantes puede mejorar el funcionamiento muscular (*Powers, S.K., Hamilton, K., 1999*).

Un ejercicio moderado favorece un aumento de los niveles de antioxidantes intracelulares en las células inmunitarias, y por lo tanto de su función. Por otra parte, un ejercicio con sobreentrenamiento produce una disminución de esos niveles intracelulares, con una consecuente menor función inmunitaria. La realización del ejercicio físico, de forma adecuada, tanto per se como en su capacidad de aumentar los

niveles de antioxidantes celulares, permitiría recuperar el balance oxidantes/antioxidantes a la vez de incidir positivamente en la función inmunitaria. Además también lo haría en la del sistema nervioso (SN) y sistema endocrino (SE), y en sus conexiones bidireccionales evitando el deterioro homeostático causado por el estrés oxidativo. (Marcos Becerro, JF., Galiano Orea, D., 2004).

Un ejercicio intenso o prolongado puede superar las defensas antioxidantes, entre las que se encuentran las vitaminas C y E, y los tioles, existiendo una red de unión entre todos ellos así como con las enzimas antioxidantes. La evidencia de un estrés oxidativo durante el ejercicio se demostró midiendo el daño a las biomoléculas y el estado de las defensas antioxidantes, particularmente el glutatión. Existe escasa evidencia de que los antioxidantes aumenten el rendimiento en los deportistas, pero un número extenso de trabajos mostraron que aquellos pueden disminuir el estrés oxidativo. ***Esto sugiere que el beneficio secundario a la administración de antioxidantes debe ser esperado en el largo plazo.***

En un estudio realizado recientemente se demuestra que la suplementación con antioxidantes disminuye el estrés oxidativo inducido por el ejercicio en adultos jóvenes con sobrepeso. Los marcadores inflamatorios y lipídicos pueden ser atenuados también con antioxidantes. En dicho estudio se establecieron 4 grupos, recibiendo como suplementos vitamina E, vitamina C y beta-caroteno o placebo. Después del ejercicio disminuían los niveles de hidroperóxidos, IL-6, colesterol en los grupos que ingirieron antioxidantes comparados con el placebo. (Vincent HK, et al., 2006).

Se puede concluir afirmando que un ejercicio moderado y la ingestión de cantidades apropiadas de antioxidantes producen una revitalización del sistema inmunitario y a vez que de la homeostasis corporal, lo que repercute en una mejora de la salud del individuo y de su calidad de vida.

## 2. ESTRÉS OXIDATIVO.

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir, el balance entre prooxidantes y

antioxidantes. Este desequilibrio se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes conduciendo al daño celular. (Mastaloudis, A., et al, 2001).

En el organismo se forman continuamente una serie de moléculas o átomos que presentan electrones no apareados en su último orbital electrónico y según Halliwell y cols se conocen como radicales libres (RL), los cuales muestran en general una gran agresividad oxidativa celular. Su carga puede ser positiva, negativa o neutra. Su situación energética es muy inestable por lo que son muy reactivos y de vida media corta. Su presencia genera una cadena de reacciones de transferencia de electrones con las moléculas vecinas, que a su vez se convierten en radicales libres. Sólo en caso de unión de dos radicales libres desaparecerá su actividad como tal (Halliwell, B., et al, 1992). La interrelación de los radicales libres con las moléculas de su entorno produce un daño denominado estrés oxidativo (que se debe al exceso de radicales libres), implicado en diversas patologías en el ser humano, en campos tan dispares como la neurología, cardiología, oftalmología, dermatología, gastroenterología, nefrología, o gerontología. (Davies, K.J., 1995; Reiter, R.J., 1998).

Se consideran cuatro sistemas celulares básicos como elementos diana del daño producido por los radicales libres: la respiración aeróbica, la síntesis de proteínas, la membrana celular y el ADN de la célula (Halliwell, B., et al, 1992) (Halliwell, B., Chirico, S., 1993) (Nevado Jiménez, A., 2001), (Molina, A., et al ,2002). El estrés oxidativo se produce debido a varias fuentes, que se exponen en la tabla, en la que se observa cómo los radicales libres no sólo se generan por la producción a partir de oxígeno, sino que existen otras moléculas que los producen, procediendo generalmente de cadenas metabólicas.

Fuente	Mecanismo
-Transporte mitocondrial de electrones	Pérdida de superóxido debido a la reducción ineficiente de oxígeno
-Iones metálicos de transición	Cu <sup>++</sup> y Fe <sup>++</sup> : radicales hidroxil
-Inflamación	RL liberados por fagocitos activados
-Enzimas v.g.: xantin-oxidasa	Superóxido tras reperusión por isquemia
-Drogas v.g.: paraquat, paracetamol	Intermediarios metabólicos
-Humo de cigarrillos	Fase gaseosa rica en radicales libres
-Radiación	Rayos X, luz ultravioleta

**Tabla I.5. Fuentes de estrés oxidativo en fisiopatología humana.**

Muchos de los RL incluyen al oxígeno y también existen determinadas moléculas con oxígeno que no presentan electrones no apareados, pero si tienen reactividad molecular. Ambos tipos de moléculas o átomos se engloban bajo el nombre de “Especies Reactivas de Oxígeno” (ERO) o (ROS), son importantes tanto por su abundancia como por su peligrosidad, como por ejemplo, el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) (Fridovich, I., 1989).

En analogía al término “estrés oxidativo”, Hausladen y Stambler han denominado “estrés nitrosativo” a la excesiva o desregulada formación del radical óxido nítrico (NO) y especies reactivas del Nitrógeno (ERNs) derivadas del mismo.

La reactividad y toxicidad de los RLs y EROs, se ha relacionado con el proceso de envejecimiento y con la patogénesis de muchas enfermedades crónicas degenerativas. El organismo intenta obviar dicha toxicidad mediante una serie de sistemas de defensa antioxidante, que no son eficaces al 100% por lo que hay que procurar es reducir al máximo el estrés oxidativo. En la siguiente tabla se muestran los dos tipos de factores citados destacando que en ambos casos existen componentes nutricionales y que mientras que los ácidos grasos poliinsaturados van a implicar o facilitar un daño oxidativo, los monoinsaturados que abundan en el aceite de oliva virgen extra, van a minimizar los efectos del mismo.

<b>Factores oxidantes</b>	> <	<b>Sistemas antioxidantes</b>
Nutricionales (Prooxidantes o componentes oxidables fácilmente: AGP, ión ferroso)		Nutricionales(antioxidantes o componentes difícilmente oxidables: Vitaminas A, C Y E, beta-carotenos, AGM, compuestos fenólicos)
No nutricionales (RL, ERO, ERN).		No nutricionales (Melatonina)

**Tabla I.6. Factores que intervienen en el balance oxidativo celular.**

AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados.

AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados.

RL: Radicales Libres.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

El estado de óxido-reducción de la célula está determinado por el equilibrio entre los compuestos biológicos oxidados y reducidos presentes en ella, principalmente aquellos que se encuentran en mayor proporción.

## 2.1. Radicales libres.

Las reacciones de óxido-reducción tienen una amplia distribución en el metabolismo celular. La transformación de los nutrientes orgánicos y la obtención de la energía química almacenada en sus enlaces involucra reacciones químicas de oxido-reducción que suceden en el proceso de respiración celular que acontece en las mitocondrias durante el cual se consume oxígeno, pero la célula oxida las moléculas orgánicas a través de secuencias de reacciones que no implican la adición directa del oxígeno. La oxidación hace referencia a la eliminación de electrones, no sólo a la adición de átomos de oxígeno, y la reducción implica adición de electrones. En las células, los átomos de carbono y de hidrógeno de las moléculas orgánicas, que se encuentran en un estado rico en electrones (reducido) se convierten en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O que han cedido electrones y por tanto, están muy oxidados. Ésta es su forma más estable y, por ello, la transformación es energéticamente favorable.

Sin embargo, durante la respiración celular además de consumirse oxígeno y de

obtenerse energía generándose ATP, quedando como subproductos  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , también se producen otras moléculas residuales: las especies reactivas del oxígeno (EROs) y otros radicales libres (RL). En la siguiente tabla se nos muestran distintos tipos de radicales libres, su vida media y los principales blancos biológicos:

RADICAL	NOMBRE	VIDA MEDIA	BLANCO BIOLÓGICO TÍPICO
$\text{O}_2^-$	Superóxido	$10^{-5}$ s	Enzimas
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno*	Estable	PUFA**
$\text{HO}^\cdot$	Radical hidroxil	$10^{-9}$ s	Todas las moléculas
$\text{R}^\cdot$	R-ilo	$10^{-8}$ s	Oxígeno
$\text{RO}^\cdot$	R-oxilo (alcoxilo)	$10^{-6}$ s	PUFA
$\text{ROO}_2^\cdot$	R-dioxilo (peroxilo)	7 s	PUFA
$\text{ROOH}^\cdot$	Hidroperóxido		PUFA
$^1\text{O}_2$	Singlete de oxígeno	$10^{-6}$ s	$\text{H}_2\text{O}$
$\text{HOCl}$	Ácido hipocloroso	Estable	Varios
$\text{NO}^\cdot$	Radical de óxido nítrico	-1s	Varios

**Tabla I.7. : Vida media y blanco biológico típico de los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (modificado de Reiter. Front Neuroendocrinol 1995; 16:383-415).**

\*Aunque El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es estrictamente un radical libre a altas concentraciones posee cierta toxicidad. \*\*Ácidos grasos poliinsaturados. R= habitualmente, un radical lipídico.

Los radicales libres son átomos o moléculas inestables, altamente reactivas que atacan los enlaces de proteínas de los tejidos, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, carbohidratos, y los ácidos nucleicos de las células. Su presencia

genera una cadena de reacciones de transferencia de electrones con las moléculas vecinas, que a su vez también se convierten en radicales libres.

Al ejercer su acción los radicales libres sobre las biomoléculas orgánicas se activan reacciones en cadena que podrían incluso llevar a la apoptosis celular (muerte de la célula). La existencia del electrón desapareado, es lo que confiere al RL su altísima reactividad con gran cantidad de moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc), ya que tiende rápidamente a ganar o ceder un electrón para conseguir así una conformación estable. Esta misma rapidez hace que su vida media sea muy corta, lo cual hace enormemente difícil su estudio (Halliwell, B., et al, 1992). En la siguiente ilustración se muestran las principales especies reactivas y sus blancos biológicos (Ilustración I.1):



Ilustración I.1. Especies reactivas que se generan en las células y los efectos que ocasionan en las distintas biomoléculas.

### 2.1.1. Tipos de radicales libres.

En los sistemas biológicos, los radicales libres se están formando continuamente, siendo algunos ejemplos los siguientes:



Tabla I.8. Ejemplos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

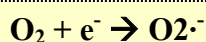
<i>Radical</i>	<i>Nombre</i>	<i>Moléculas diana</i>
$O_2^{\cdot-}$	Superóxido	Enzimas
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno	Ácidos grasos insaturados
$OH^{\cdot}$	Hidroxilo	Todas las moléculas
R	R-ilo	Ácidos grasos insaturados
RO	R-oxilo	Ácidos grasos insaturados
ROO	R-dioxilo(Peróxido)	Ácidos grasos insaturados
ROOH	Hidroperóxido	Ácidos grasos insaturados
O	Oxígeno singlete	Distintas moléculas
NO	Nitroxilo	Distintas moléculas
CCl	Triclorometileno	Oxígeno

De todos ellos, destaco **las características más primordiales** de los siguientes:

#### ● Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

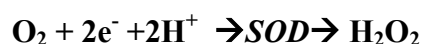
Este radical libre actúa de manera indirecta sirviendo de fuente para la producción de otros radicales libres o  $H_2O_2$ , por lo que en principio es menos reactivo que otros (Fridovich, I., 1976). Se produce como consecuencia de una reducción monovalente o monoelectrónica del oxígeno molecular siendo su sitio preferente de formación la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Borevis, A., Chance, B., 1983), reacciones catalizadas por la citocromo P450 a nivel del retículo endoplasmático hepático, la xantino-oxidasa y la aldehído oxidasa. También se produce por la

autooxidación de moléculas como ascorbato, catecolaminas, tioles, hemoproteínas, hidroquinonas, etc ( McCord, JM.,1989):



### ● **Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no presenta electrones desapareados por lo que sería un radical libre en sentido estricto, aunque si tiene la capacidad de atravesar membranas celulares e interviene en la formación de radicales hidroxilo (Chance, B., Sies, H., 1979). Ejerce su actividad citotóxica de forma indirecta mediante compuestos fabricados a partir de él y otro agente reductor o un ión metálico como el hierro en su forma ferrosa.(Czapski, G., et al, 1983) Su formación se basa en la dismutación del anión superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) o directamente, por reducción bivalente del oxígeno:



En condiciones normales las mitocondrias constituyen la principal fuente de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cuando se produce un aumento de la presencia de oxígeno, como ocurre en casos de hiperoxia, la producción del radical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta (Chance, B., Sies, H., 1979). Los peroxisomas y el citosol celular constituyen, respectivamente, el segundo y tercer centro de producción más frecuentes de peróxido de hidrógeno (Borevis A, 1973).

El peróxido de hidrógeno podría inducir daño oxidativo lejos de su sitio de generación y también podría ser una molécula señal que induce algunos genes relacionados con el estrés oxidativo. (Sureda, A. et al, 2005).

### ● **Radical hidroxilo (OH·).**

Es el radical más reactivo de todas las especies reactivas de oxígeno, siendo capaz de reaccionar de modo directo con cualquier sustancia o molécula cercana. Su principal fuente de producción la constituye la descomposición del peróxido de

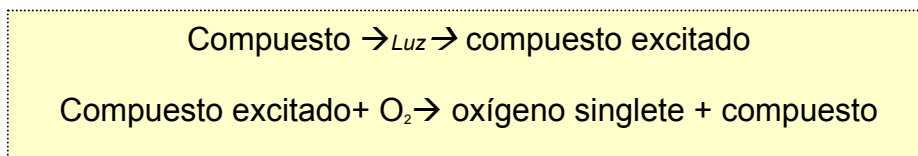
*Tesis Doctoral* \_\_\_\_\_ *INTRODUCCIÓN*  
hidrógeno en presencia de metales de transición, fundamentalmente hierro y cobre, como ya se ha comentado previamente. Existen en general varios modos de formación de OH·:

- a) Fisión del agua provocada por exposición a radiaciones ionizantes.
- b) Reacción de Fenton.
- c) Fotones del peróxido de hidrógeno.
- d) Interacción radical-peróxidos orgánicos.
- e) Reducción del ozono por transferencia electrónica.

Al radical hidroxilo se le considera uno de los principales iniciadores de la peroxidación lipídica (*Ursini, F., et al, 1982*).

### ● Oxígeno singlete ( $^1O_2$ ).

Se forma cuando se absorbe energía por parte de un átomo de oxígeno que provoca un cambio en la disposición de los electrones por alteración de la orientación de uno de sus espines. En la Naturaleza, esto sucede fundamentalmente cuando determinadas sustancias reciben energía lumínica en presencia de oxígeno (*Halliwell, B., Chirico, S., 1993*).



Compuestos con esta capacidad de fotosensibilidad y formación de oxígeno singlete son los colorantes, ciertas drogas como las tetraciclinas y sustancias presentes en el cuerpo humano como la bilirrubina, las riboflavinas y las porfirinas (*Halliwell, B., Chirico, S., 1993*).

La capacidad lesiva de esta especie radica en la reacción directa con macromoléculas como los ácidos grasos (*Halliwell, B., Chirico, S., 1993; Sevanian, A., Hochstein, P., 1985*).

Cabe destacar que en las especies reactivas de Oxígeno (EROs) se incluyen no sólo a los radicales del oxígeno propiamente dichos, sino también a algunas moléculas,

no radicales, derivadas del oxígeno e involucradas directamente en la producción de radicales del oxígeno, como puede ser el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete y el ácido hipocloroso. Se puede apreciar la vulnerabilidad oxidativa de los ácidos grasos insaturados, como objetivos diana evidentes de los RL y las EROs.

Siempre que un radical cede un electrón o toma un electrón o se une a una molécula no radical, ésta se transforma en radical, siendo una característica importante en las reacciones de radicales con no radicales el hecho de que normalmente se propagan a través de reacciones en cadena, y así un radical produce otro y éste otro y así sucesivamente. Sólo cuando dos radicales se unen, desaparecen como tales radicales (Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1999).

Los radicales libres se forman continuamente en el organismo de forma accidental, como en los casos de escape de electrones de la cadena de transporte mitocondrial o bien en reacciones de autooxidación. También de modo deliberado, como en la activación de los fagocitos. Los radicales libres, en ocasiones, tienen una misión fisiológica predeterminada en los seres vivos, bien formando parte de sistemas enzimáticos (Stubbe, J., 1990), bien actuando como bactericidas o bien encontrándose involucrados en la síntesis de mediadores inmunes.

## **2.2. Mecanismos celulares de producción de radicales libres.**

### **2.2.1. Cadena respiratoria mitocondrial.**

La cadena respiratoria mitocondrial permite gracias al transporte de electrones, que provienen del catabolismo de los nutrientes energéticos, la liberación de energía de esos nutrientes que es transferida a los enlaces energéticos del ATP, en la fosforilación oxidativa acoplada a la misma.

Sabemos que la cadena de transporte de electrones requiere oxígeno molecular como aceptor final de electrones, que procede del oxígeno atmosférico, pero una parte del mismo (del 2 al 5%) se convierte en radical superóxido, debido a que un pequeño porcentaje de electrones “escapa” de la cadena respiratoria, conduciendo a la formación del citado RL. Cualquier situación en la que se produzca un aumento del consumo de

oxígeno tendrá como consecuencia una mayor formación de radical superóxido. Esto puede ocurrir fundamentalmente en dos situaciones: cuando la concentración o el consumo de oxígeno aumenta, por ejemplo, durante el ejercicio físico (Litarru, G., 1994; Aw TY., et al, 1996), y en casos en que la cadena mitocondrial de transporte de electrones se encuentra completamente reducida, como ocurre en los períodos de isquemia y repercusión (McCord, JM., 1989; Flitter, WD.,1993).

En condiciones normales es ésta la mayor fuente formadora de radicales libres, debido a la formación de radical hidroxilo secundaria a la transformación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno, que posteriormente se transforma en el citado radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss (Boreis A., Cadenas, E, 1975) (Borevis, A., Chance, B., 1973).



**Figura I.1. Reacción de Fenton, en la que se muestra la generación de radicales hidroxilo mediante una reacción catalizada por metales de transición, en presencia de peróxido de hidrógeno y reductores como el ácido ascórbico.**

Posteriormente, a través de la superóxido dismutasa, se forma otra ERO, el peróxido de hidrógeno (Sjodin, et al, 1990). Dado que la formación del radical superóxido es dependiente del flujo de electrones en la cadena, cualquier situación que aumente el consumo de oxígeno, como ocurre por ejemplo con la actividad física, aumentará proporcionalmente la producción del radical superóxido. En general, la producción de estos radicales libres es proporcional a la tasa metabólica. Hay que resaltar que la formación de RL a través de la cadena respiratoria, es el sistema cuantitativamente más importante de producción de RL.

### 2.2.2. Xantina oxidasa.

La alteración de los mecanismos homeostáticos celulares, como puede suceder en la hipoxia o la isquemia, puede conducir a un aumento del calcio citosólico y a la activación de enzimas dependientes del calcio, entre las que se encuentra una proteasa que modifica covalentemente la xantina deshidrogenasa, convirtiéndola en xantina oxidasa que a su vez cataliza la transformación de hipoxantina a xantina y ésta a ácido úrico, que es clave en la degradación permanente de los ácidos nucleicos. En esta reacción se produce anión superóxido y quizás también singletes de oxígeno (*Littarru, G., 1994*). Esta alteración se ha descrito en procesos de isquemia/reperfusión de oxígeno (*Friedl HP., et al, 1990*).

### 2.2.3. Metabolismo del ácido araquidónico.

La estimulación de la fosfolipasa A2, como sucede en la reperfusión tras isquemia, en presencia de iones calcio, conduce a la liberación de ácido araquidónico a partir de las membranas celulares. Mediante la acción catalítica de dos enzimas distintos, la ciclooxigenasa y la hidroperoxidasa, el ácido araquidónico se oxigena en primer lugar a prostaglandina G2 y posteriormente a prostaglandina H2. Durante este último paso se produce el radical superóxido, cuando están disponibles el NADH o el NADPH. La actividad hidroperoxidasa conduce asimismo a la producción de oxígeno singlete (*Kukreja, RC., et al, 1986*). Por tanto, la formación de prostaglandinas y leucotrienos a partir del ácido araquidónico (C20:4n6) puede ser fuente de producción de radicales libres, fundamentalmente en el endotelio vascular. Vía ciclooxigenasa se pueden generar radicales superóxido (*Kukreja, RC., et al, 1986*); vía lipooxigenasa parece haber una producción de oxígeno singlete (*Duran, N., et al, 1984*).

### 2.2.4. Fagocitos y otras fuentes de radicales.

Tanto los fagocitos como los leucocitos PMN, constituyen una fuente biológica importante de aniones superóxido y de otros tipos derivados reactivos del oxígeno. Estos tipos celulares de glóbulos blancos poseen diversos mecanismos microbicidas, el más importante de los cuales depende del oxígeno.

En estado de reposo la principal vía energética utilizada por los fagocitos es la glucólisis y de hecho, estas células contienen muy pocas mitocondrias. La alteración de su membrana plasmática desencadenada por el contacto con los microorganismos, provoca un rápido aumento en el consumo de oxígeno. Tras la fagocitosis el oxígeno se utiliza realmente para producir derivados reactivos del oxígeno, dotados de una fuerte actividad microbicida (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, reacciones en las que intervienen enzimas como la superóxido dismutasa, SOD) (Halliwell, B., y Gutteridge, JM., 1999). El radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) se produce por la síntesis de NADPH a partir de hexosas monofosfato, en el contexto de la hiperutilización de oxígeno durante la actividad fagocitaria (Babior, BM., 1984; Winrow, VR., et al, 1993). A partir del anión  $O_2^{\bullet-}$  se generan  $H_2O_2$  y ácido hipocloroso, que a su vez oxida los grupos sulfhidrilo. También se produce óxido nítrico durante la fagocitosis, cuya reacción con el  $O_2^{\bullet-}$  da lugar a la formación de  $OH^\circ$ .

La acción microbicida, además de a través del anión superóxido, se puede llevar a cabo gracias a la mieloperoxidasa, que oxida a los halogenuros a halógenos y éstos en contacto con aniones superóxidos, producen hipocloritos o hipobromitos de claro efecto microbicida (Halliwell, B., y Gutteridge, JM., 1999). La peligrosidad del daño a membrana por RL durante los procesos de fagocitosis, aumenta por un incremento del metabolismo del ácido araquidónico, el cual se libera en más cantidad en el citado proceso.

### 2.2.5. Metales en la producción de radicales.

El hierro y el cobre son los que participan en la producción de los derivados oxigénicos más agresivos. En ocasiones precisan la presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico. El hierro en su forma ferrosa participa en la generación de radical hidroxilo mediante la clásica reacción de Fenton (Minotti, G., Aust, D., 1987; Anuona, OL., et al, 1991):



El Cobre es un metal iónico que tiene una mayor capacidad en la formación de especies reactivas del oxígeno que el hierro, ocasionando como resultado un mayor daño a las bases de ADN (Guyton et al, 1993).

Los organismos tienden a evitar la disponibilidad de estos metales ya sean unidos a proteínas de transporte como de almacenamiento. Sin embargo, el estrés oxidativo por si mismo puede movilizar el hierro desde las estructuras que las contienen, como son citocromos de la cadena respiratoria (Halliwell, B., Gutteridge, JM., 1995).

#### **2.2.6. Activación de xenobióticos.**

Durante la activación metabólica de los xenobióticos, se produce un “goteo” de electrones desde el citocromo P450 en el retículo endoplasmático de los hepatocitos formándose radical superóxido (Halliwell, B., Gutteridge, JM., 1999).

#### **2.2.7. Radiaciones ionizantes.**

En la composición del aire atmosférico encontramos compuestos químicos como el dióxido de nitrógeno, el ozono y el óxido nítrico. El humo del tabaco tiene altas concentraciones de óxido nítrico, radicales peroxilo y radicales centrados en el carbono, entre otros, por lo que supone una fuente importante de producción de radicales libres, cuyo efecto lesivo se ve aumentado por el importante acúmulo de hierro que existe en los pulmones de los fumadores. También se ha observado una potenciación de los efectos de estas sustancias por la acumulación de macrófagos en el aparato respiratorio (Ryrfeld, A., et al, 1993). Por otro lado, tanto las radiaciones ionizantes como la luz solar son capaces de activar un gran número de átomos y moléculas, entre ellas el oxígeno, promoviendo la producción de tripletes excitados mediante dicha excitación a través del cambio de órbita de los electrones (Foote, Ch., 1982).

En resumen, por estas y otras causas menos importantes se producen situaciones en las que se induce un estrés oxidativo, implicado a lo largo plazo en multitud de patologías como enfermedades pulmonares, y desórdenes inmunológicos, isquemia miocárdica y cerebral, aterosclerosis, artritis reumatoide, distrofias musculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades inducidas radiaciones, etc.



### **2.3.Efectos de los radicales libres sobre moléculas y sistemas biológicos.**

Los radicales libres pueden causar las siguientes alteraciones patológicas:

- 1) Desnaturalización de las cadenas de DNA.
- 2) Liberación de factores quimiotácticos que provocan la llegada de leucocitos activados que a su vez generan más radicales libres.
- 3) Inicio de la peroxidación lipídica (con la subsiguiente alteración de membranas), que a su vez genera hidroperóxidos, aldehidos y endoperóxidos, con daño en las proteínas y DNA.
- 4) Desnaturalización de las proteínas presentes en el citosol y las enzimas de membrana, incluyendo en inhibidor de  $\alpha$  1-antitripsina.

Los radicales libres producen daño sobre todo a cuatro sistemas celulares básicos: la respiración aeróbica, la síntesis de proteínas, la membrana celular y el ADN celular (Nevado Jiménez, A., 2001).

#### **2.3.1. Ácidos nucleicos y activación génica.**

El estrés oxidativo va a ocasionar sobre el DNA un incremento del número de mutaciones, entrecruzamientos, roturas en las cromátidas o pérdida de fragmentos cromosómicos, siendo más frecuentes las alteraciones en el DNA del tipo fragmentación y modificaciones oxidativas en las bases púricas y pirimídicas (Roche, E., et al, 1996). Los radicales libres de oxígeno, y en particular el hidroxilo, presentan una gran afinidad para la fijación a estas bases, modificando la estructura del DNA y apareciendo bases oxidadas e hidroxiladas del DNA en orina, fundamentalmente Timina (Roche, E., et al, 1996).

La interacción de los radicales libres del oxígeno con el DNA se puede producir de manera directa (ej. Radical hidroxilo) o indirecta (ej.  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ) en presencia de metales de transición y con la posterior formación de radicales hidroxilo. El radical  $H_2O_2$  es tóxico debido a su capacidad de atravesar membranas y producir radicales hidroxilo (Nassi-Caló, L., et al, 1989; Breimer, LH., 1990). La lesión producida por los radicales libres en el DNA mitocondrial se ha relacionado de manera llamativa con los procesos de envejecimiento (Richter, C., et al, 1988). En palabras de Miquel, “el daño del DNA nuclear produciría cáncer, y el de las mitocondrias, envejecimiento” (Miquel, J., 1989).

Por lo tanto, el ARN como el ADN son objetivos de los RL/EROs. Los daños producidos a ambos cuantificados *in vivo* midiendo las bases púricas y pirimidínicas modificadas, como resultado de las escisiones y reparaciones del ADN, ascienden a cerca de 10.000 bases por célula al día. Es evidente, por lo tanto que a pesar de la existencia de sofisticados y eficaces mecanismos de control celular una fracción de tales alteraciones puede escapar a los mecanismos de reparación, lo que sugiere que el daño potencial de carácter mutagénico y cancerígeno provocado por RL/EROs sea importante (Kensler y Trush, 1983) así como a suma de tales alteraciones da como resultado el envejecimiento progresivo.

Los puntos de ataque de RL/EROs son tanto las bases como las pentosas de los ácidos nucleicos. Los efectos pueden ir desde alteraciones del sector (deoxi) ribosílico de las bases a roturas simples o dobles de la hélice. Incluso se pueden producir más drásticas y profundas modificaciones, como adiciones de grupos químicos, apertura del anillo, redistribuciones moleculares que dan origen a cambios de bases simples (de G/C a A/T) o incluso, deleciones de bases que producen sitios abásicos con afectación de la función génica correspondiente, los cuales a través de una beta-eliminación puedan causar rotura de la cadena.

Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados con especies secundarias peligrosas, como sucede con el hidroperóxido del ácido linoleico que provoca una rotura de la doble hélice del ADN.

Los RL también son capaces de activar la transcripción génica, induciendo de forma muy rápida la expresión de determinados genes que codifican factores de transcripción, los cuales participan en la modulación del crecimiento celular, en la diferenciación, en el desarrollo e incluso pueden activar la apoptosis, una forma de muerte celular programada (Halliwell, B., Gutteridge., JM, 1999). De este modo, los RL tendrían, al propiciar la apoptosis, un papel en el desarrollo del envejecimiento.

### **2.3.2. Proteínas.**

Los radicales libres van a ocasionar cuando interactúan con las proteínas cambios en su estructura, pérdida de su capacidad funcional y entrecruzamientos catalíticos (Winrow, VR., et al, 1993). Se puede enumerar dos tipos el daño de los

radicales sobre las proteínas: a) ataques difusos, que originan modificaciones generalizadas, y b) ataques selectivos, que dan lugar a modificaciones en puntos concretos de la proteína. Se producen alteraciones en diversas regiones de la proteína, lo conlleva modificaciones en su estructura, agregaciones intra e intercatenarias y fragmentación proteica. Las modificaciones específicas se caracterizan por su gran selectividad. Los aminoácidos más frecuentemente atacados son la histidina, la prolina, la lisina y la arginina (*Litarru, G., 1994*).

Los citados daños en las proteínas conllevan alteraciones en las estructuras de las que éstas forman parte, por lo que se producen anomalías en la permeabilidad celular, daños en el citoesqueleto.

La oxidación de enzimas y proteínas estructurales se producen como consecuencia de la acción de los RL/EROs, lo que conlleva a la pérdida de la funcionalidad en el primer caso y alteraciones graves en la estructura celular en el segundo (*Lunec, J., 1992*). La posibilidad de que una proteína sea atacada por RL/EROs depende de su composición aminoacídica y de la accesibilidad de la especie oxidante a los aminoácidos más reactivos, como son histidina, metionina, cisteína, triptófano y tirosina. El inicio de una reacción en cadena se ve favorecido por la presencia de iones metálicos, como los de transición formando complejos en el interior del ambiente proteico. Dichos iones son capaces de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno, provocando un efecto sitio-específico. El resultado es la conversión de algunos residuos aminoácidos en derivados carbonilo que pueden ser utilizados como marcadores del daño producido.

Los RL/EROs también facilitan la formación de enlaces cruzados proteína-proteína, así como la fragmentación de las cadenas proteicas. Por otra parte, las proteínas pueden ser objeto de ataque por radicales secundarios, como los que derivan de la peroxidación lipídica. Este es el caso el malondialdehído que pueden dar lugar a productos estables de enlaces cruzados con aminoácidos específicos. En conjunto, el daño oxidativo a las proteínas celulares incluye cambios conformacionales, pérdida de actividad enzimática, aumento de la susceptibilidad a las proteasas y alteraciones de la inmunogenicidad (*Mugli, R., 1993*).

### **2.3.3. Ácidos grasos insaturados. La peroxidación lipídica.**

La peroxidación lipídica es un daño oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados producido mediante un proceso autocatalítico incontrolable. El hecho de que los fosfolípidos sean componentes básicos de todas las membranas celulares resalta la importancia del proceso oxidativo. El proceso lo comienzan las especies reactivas del oxígeno, formándose una cascada de reacciones y producción de radicales libres con la formación de peróxidos orgánicos y otros productos a partir de ácidos grasos insaturados (Díaz, J., et al, 1998).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) existen como ácidos libres (ácido araquidónico) como tioésteres (AcilCoA) y como ésteres (fosfo y esfingolípidos, ésteres del colesterol, triglicéridos). La oxidación de APG se conoce como peroxidación lipídica., siendo importante la que ocurre en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los ácidos grasos más susceptibles de sufrir este proceso son los que presentan mayor número de dobles enlaces, como el araquidónico (C<sub>20</sub>:4n6), el docosahexaenoico (C<sub>22</sub>:6n3) y el linoleico (C<sub>18</sub>:2n6). Este fenómeno oxidativo es la forma más conocida de la toxicidad de RL/ EROs. Además, esto explica las alteraciones estructurales y funcionales en las que están implicados RL y EROs en numerosas enfermedades, la lipoperoxidación ha estado relacionada con numerosos procesos patológicos, siendo en palabras de Halliwell y Chirico, “la más clara evidencia de que los radicales libres están involucrados en muchas enfermedades humanas” (Halliwell, B., Chirico, S., 1993; Halliwell, B., Gutteridge, JM., 1999).

La cadena de reacciones de los RL consiste en tres etapas esenciales: inicio, propagación y terminación. La propagación continúa hasta que dos RL se unen para terminar la cadena. Por tanto, un único evento de iniciación puede provocar la conversión de numerosas cadenas de AGP en hidroperóxidos lipídicos, lo que significa que la peroxidación lipídica puede ser amplificada hasta que se agote la disponibilidad de oxígeno y de cadenas de AGP no oxidadas (Halliwell y Chirico, 1993).

Por otra parte, la duración y la velocidad de la cadena de peroxidación dependen directamente del grado de insaturación lipídica. Para una serie de ácidos grasos insaturados de uno a seis dobles enlaces, como oleico, linoleico, esta velocidad aumenta

según la relación 0,025:1:2:4:6:8. El ácido oleico del aceite de oliva es más resistente al ataque oxidativo que otros ácidos grasos insaturados y comparativamente al ácido linoleico presente en aceites de semillas, la velocidad de la cadena de peroxidación es 80 veces menor. La peroxidación lipídica da origen a numerosos productos (muchos de ellos biológicamente activos y citotóxicos), que pueden dividirse en tres categorías principales (*Esterbauer, H. 1993*):

### 1. Productos de rotura de la cadena.

Se encuentran sustancias que se obtienen de la rotura de dobles enlaces C-C adyacentes a un grupo hidropéroxido, por lo que es posible identificar tres clases de moléculas importantes:

-Alcanales, como el malondialdehído (MDA), que a través de la reacción con tioles proteicos y /o enlaces con grupos amino de las proteínas, pueden causar un importante daño celular.

-Alquenes. Son productos con una vida media más bien larga. Pueden difundir del lugar de origen a la membrana, modificando su integridad estructural y funcional, su fluidez y su permeabilidad. Puesto que estos sucesos tienen lugar en la zona interna de la membrana biológica, se pueden ver afectados todos los fenómenos de la señal celular y el flujo iónico. También se pueden alterar propiedades apolipoproteicas, modificando las características inmunológicas. En el caso de que se formen junto a los ácidos nucleicos, pueden alterar la secuencia del mensaje de determinados genes y/o la estructura molecular del ADN/ARN, provocando así un daño todavía mayor en los mecanismos genéticos y/o en la biosíntesis proteica.

-Alcanos, como el pentano y el etano que son productos terminales de la oxidación de los PUFAS. Estos compuestos se emplean en el laboratorio para ver el grado de daño de esos ácidos grasos.

### 2. Productos formados de la reordenación del LOOH, o reordenación y sucesivas oxidaciones (hidropéroxidos, epóxidos, dihidropéroxidos, endopéroxidos bicíclicos y compuestos mono, di-, tri-, ceto- y epoxi-hidroxidos).

### 3. Productos de oxidación de alto peso molecular por reacciones de polimerización.

En resumen, lo más destacable de la peroxidación lipídica es que es más

acusada cuanto mayor es el grado de insaturación de la membrana celular, y esto está condicionado, en mayor o menor grado, por el grado de insaturación de los ácidos grasos dietéticos, los cuales determinan en ese grado la composición de ácidos grasos de la membrana. El producto final de la peroxidación lipídica es la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos y metabolitos derivados, algunos de ellos altamente tóxicos, como los aldehídos malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal. Se forman también dihidrocarburos como el pentano o el etano, cuya eliminación por la respiración los hace útiles como marcadores del proceso (*Paraidathalu, T., et al, 1992*).

<b>n-Alcanales</b>	<b>2-Alquenes</b>	<b>4-Hidroxi-alquenes</b>	<b>Otros</b>
Propanal	Acroleína	4-Hidroxinonenal	Malondialdehído
Butanal	Pental	4-Hidroxiheptenal	2,4-Heptadienal
Pental	Hexenal	4-Hidroxi-2,5-nadlenal	2,4-Decadienal
Hexanal	Octenal	4,5-Dihidrodecenal	5-Hidroxiocetanal
Nonanal	Nonenal		Butanona

**Tabla I.9. Algunos de los productos secundarios de la peroxidación de los lípidos.**

Como conclusión podemos afirmar que la peroxidación lipídica es un proceso con gran poder destructiva debido al daño directo celular (por ataque directo a las membranas, ocasionando un detrimento en la fluidez de membrana, resistencia eléctrica, así como cambios en sus propiedades y alteración en su función de barrera (*Orrenius, S., et al, 1989*), y el indirecto (por liberación de productos reactivos), (*Cheeseman, KH., 1993*).

#### **2.3.4. Biomoléculas de bajo peso molecular.**

Como son las vitaminas (ácido ascórbico, carotenoides, alfa-tocoferol, ubiquinonas), hidratos de carbono (glucosa, ribosa), aminoácidos (histidina, triptófano, cisteína, metionina), ácido úrico, colesterol, y pequeños péptidos solubles como el glutatión (*Halliwell, B., Guteridge, JM., 1999*). Las reacciones de RL con las vitaminas A, C, E y ubiquinonas, glutatión y ácido úrico, llevan habitualmente a la finalización de la cadena de reacción de radicales.

La oxidación del colesterol es de un particular interés biológico, puesto que se producen hidroperóxidos de colesterol y una familia de oxisteroles oxidados sobre el anillo beta del esterol, y estos derivados del colesterol están implicados en la aterosclerosis y en la enfermedad cardiovascular entre otras patologías. Se ha postulado que la presencia de oxisteroles en la sangre puede ser el resultado de un eficaz mecanismo antioxidante in vivo. Dicho sistema se basa en la posible interacción a nivel de la sangre y diversos tejidos de diferentes elementos oxidantes con colesterol, siendo los derivados oxidados del mismo excretados vía biliar fecal (*Haliwell, B., Gutteridge, JM., 1999*).

Con respecto a los glúcidos, cabe destacar que la importancia de la interacción entre ellos y los derivados oxigénicos y los azúcares está no sólo a nivel bioquímico, sino que se ha relacionado esta interrelación con enfermedades como la Diabetes Mellitas (*Wolff, S.P., 1987*), algunas enfermedades reumatoideas y las cataratas. El manitol y la glucosa reaccionan rápidamente con el radical hidroxilo, generándose una reacción en cadena de nuevos radicales mediante procesos de estrés oxidativo, siendo imprescindible la presencia para el desarrollo de este proceso de metales de transición (cobre o hierro) con fines catalizadores (*Nevado Jiménez, A., 2001*). El ácido hialurónico puede ser degradado en el transcurso del daño articular por la acción de radicales libres (*Greenwald, RA., 1988*).

#### **2.4. Respuesta adaptativa al estrés oxidativo.**

Se ha comprobado que el promotor de la hemooxigenasa 1 (HO-1) contiene sitios de unión a factores de transcripción AP-1, AP-2 y NF-kB, que también se activan por el estrés oxidativo, resultando la síntesis de numerosas proteínas, que se conocen como enzimas respondedoras al estrés. La inducción de la HO-1 se considera una “respuesta adaptativa” al estrés oxidativo. La respuesta adaptativa es el fenómeno celular por el cual la exposición a un agente tóxico (en concentraciones subletales) provoca una respuesta celular que protegerá a la célula contra los efectos deletéreos del mismo tóxico a concentraciones letales. Este efecto es importante en casos de estrés oxidativo. Así, se ha comprobado que la exposición a bajos niveles de radiación o a oxígeno hiperbárico aumenta las defensas antioxidantes. La terapia con oxígeno hiperbárico al hombre (100% oxígeno a 2,5 atmósferas), por ejemplo, induce cambios significativos

### **2.5.Regulación de la respuesta al estrés oxidativo.**

El gen de las superóxido dismutasas (SOD), conjuntamente con el de otras proteínas sensibles al estrés oxidativo está regulado por el regulón SoxRS. Un regulón es un grupo de genes regulados coordinadamente. En el caso del regulón SoxRS, el factor activante es el aumento en la concentración del anión superóxido. Algunos de los productos resultantes al activarse SoxRS son: la Mn SOD( enzima encargada de eliminar el anión superóxido), la Glu-6-p deshidrogenasa (que asegura el suplemento de NADPH), la endonucleasa IV (miembro del sistema de reparación del ADN dañado), la ferredoxina reductasa (que activa las Fe-S proteínas, reparando su centro 4Fe-4S, dañado por el estrés oxidativo), la mic F(disminuye la porosidad mitocondrial interna, ayudando así a recomponer el potencial de membrana).El péptido SoxR,es el sensor de óxido-reducción, que en su estado oxidado activa a la proteína SoxS. La SoxS activa vuelve a unirse al regulón SoxRS, activando su operón y causando la activación transcripcional. El regulón SoxRS representa la mitad de la defensa antiestrés intracelular. Existe otro regulón, el OxyR, que es independiente de SoxR y responde al peróxido de hidrógeno. Algunos metales, tales como el Se y el Zn por su participación como cofactores de enzimas antioxidantes (GPx y SOD citoplasmática, respectivamente), contribuyen a aumentar las defensas antioxidantes.

### **2.6.Transcendencia fisiopatológica del estrés oxidativo.**

Existen múltiples referencias de la implicación de los RL y las diferentes especies reactivas en el envejecimiento y en numerosas enfermedades como se resume en la tabla siguiente:



<i>Clasificación</i>	<i>Ejemplo</i>
Cerebro/sistema nervioso	Oxígeno hiperbárico, deficiencia en vitamina E, exposición a neurotoxinas, Alzheimer, Parkinson, Esclerosis múltiple, etc.
Envejecimiento	Envejecimiento prematuro, cáncer, etc.
Corazón y sistema cardiovascular	Cardiomiopatía alcohólica, aterosclerosis, cardiotoxicidad por antraciclinas, sobrecarga cardíaca de hierro, etc.
Inflamación y daño inmune	Glomerulonefritis, artritis reumatoide, hepatitis, etc.
Ojo	Cataratas, degeneración macular, retinopatía del prematuro.
Piel	Quemaduras, porfiria, dermatitis de contacto y otras.
Riñón	Síndromes autoinmunes renales, nefrotoxicidad por metales pesados, hemodiálisis, transplantes, etc.
Tracto gastrointestinal	Daño hepático, exposición a agentes dia betógenos, pancreatitis, lesiones gastrointestinales producidas por antiinflamatorios no esteroideos, etc.
Tracto respiratorio	Efectos del humo del tabaco, enfisema, hiperoxia, displasia broncopulmonar, exposición a agentes polucionantes, asma, fibrosis quística, etc.

**Tabla I. 10. En esta tabla se muestra la repercusión fisiopatológica del estrés oxidativo mediante los radicales libres en distintos órganos o sistemas del cuerpo y ejemplos de las alteraciones ocasionadas.**

Fuente: Halliwell y Gutteridge (1999).

Según *Halliwell y Gutteridge* (1999) antes de afirmar la implicación de los RL en un determinado proceso patológico hay que ver si se cumplen los criterios: el agente oxidante está presente en todo momento en el lugar del daño.

- i. La aparición temporal de los agentes oxidantes debe ser paralela a la aparición de la enfermedad.

La aplicación directa del agente oxidante al tejido, en concentraciones próximas a las que existen in vivo, debería reproducir en todo o en gran parte el daño observado.

- ii. La eliminación del agente oxidante del tejido implicado debería disminuir el daño producido de forma proporcional a la retirada de dicho agente.

Las enfermedades asociadas al estrés oxidativo resultan de la disminución de las reservas antioxidantes o bien del aumento en la producción de RL y EROs. Se cree además que este segundo mecanismo tiene más importancia y es más frecuente en las distintas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. De todos modos, cuando el fenómeno se produce el organismo puede responder mediante una adaptación (aumentando las defensas antioxidantes), un daño tisular (atacando a distintos tipos de biomoléculas), o mediante la muerte celular (por necrosis o a través del proceso de apoptosis).

### 3. LOS ANTIOXIDANTES.

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo, inhibiendo la tasa de oxidación. La salud del organismo depende en gran medida de eficaces sistemas de defensa antioxidantes que actúan contra el daño producido por RL y ERO (*Halliwel, B., Gutteridge, JM., 1999*).

Los antioxidantes actúan evitando el exceso perjudicial de los radicales libres en los organismos con la finalidad de mantener un equilibrio. Los enzimas antioxidantes catalizan la ruptura de radicales libres habitualmente a nivel intracelular. Cada antioxidante ejerce su función en una localización determinada. Así, por ejemplo la catalasa ejerce su acción en los peroxisomas celulares; el beta caroteno actúa tanto en el núcleo como en la membrana celular; la vitamina E, en el retículo endoplásmico. (*Fardy, H., et al, 1995*).

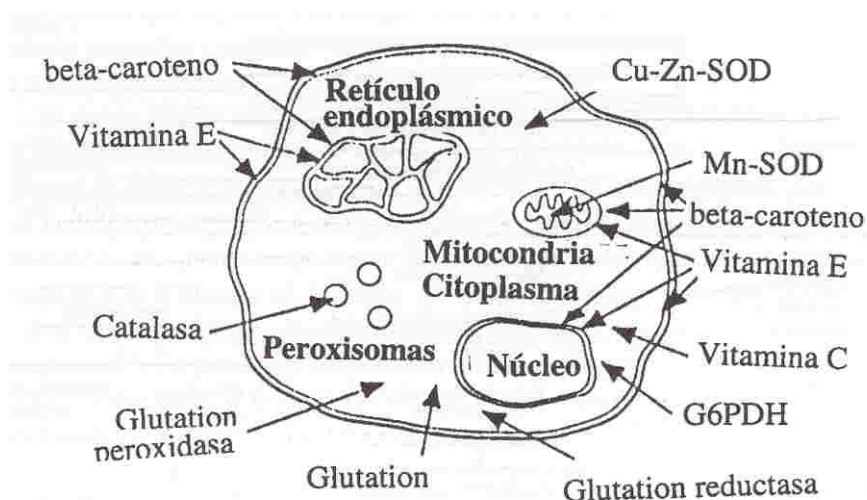


Figura I.2. Lugar específico de acción de cada antioxidante (Fardy Dis Child 1995; 73:F112-117).

El sistema antioxidante primario está constituido por las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), así como las enzimas del ciclo redox del glutatión. El sistema secundario de defensa frente al estrés oxidativo está compuesto de diversas sustancias. (Molina, A., et al, 2002). Los antioxidantes se esquematizan en las siguientes tablas, según Maxwell:

Tabla I.11: Antioxidantes naturales y sintéticos de uso terapéutico (Maxwell).

Antioxidante	Comentario
<i>Enzimas antioxidantes</i>	
<b>Superóxido dismutasa</b>	Elimina superóxido. Intracelular
<b>Catalasa</b>	Elimina H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Haem. Intracelular
<b>Glutation peroxidasa</b>	Elimina peróxidos. Intracelular. Contiene selenio. Previene formación hidroxil. Regenera ascorbato y glutatión NADPH. Detoxifica xenobióticos.
<i>Antioxidantes preventivos</i>	
<b>Transferrina</b>	Transporte de hierro, saturación 20-30%. Lactoferrina, similar en la leche.
<b>Ceruloplasmina</b>	Transporta 90% del cobre plasmático. Actividad ferroxidasa, une hierro a transferrina.
<b>Albúmina</b>	Débil unión de cobre. No daño por RL (alta concentración y turnover). Aporte fundamental de grupos tiol.

<b>Antioxidantes por retirada</b>	
Ácido ascórbico	Hidrosoluble, inhibe la lipoperoxidación Regenera la vitamina e. GSH regenera dihidroascorbato celular.
Ácido úrico	Catabolito hidrosoluble de las purinas.
Bilirrubina	Previene la peroxidación de los Ácidos Grasos unidos a la albúmina.
Thioles	Muy abundantes: albúmina y proteínas del plasma. Escasa GSH extracelular (función intracelular). GSH regenerado por otros thioles (NAC).
Tocoferol	Liposoluble (lipoproteínas y membrana). Tocoferil regenerado por el ascorbato.,
$\beta$ -caroteno	Precursor del retinol. Sinergia con tocoferol.
Ubiquinol-10	Forma reducida coenzima Q <sub>10</sub> en lipoproteína. Liposoluble. Regenera tocoferil.
Flavonoides	Polifenoles en frutas, vegetales, té y vino.
<i>Incrementan la actividad de las enzimas antioxidantes</i>	
Superóxido dismutasa	Recombinante y/o natural. Conjugada a albúmina o PEG. A dosis farmacológicas disminuye la unión de neutrófilos a epitelio.
Catalasa	Natural o encapsulada (liposomas o PEG)
Glutation peroxidasa	Actividad aumentada por el Selenio. Ebselen, la mimetiza.
<i>Antioxidantes preventivos</i>	
Desferroxiamina	Quelante del hierro, previene frente a RL ferrodendientes.

**Tabla I.12. Antioxidantes naturales y sintéticos de uso terapéutico (Maxwell).**

<i>Antioxidantes por retirada de RL</i>	
Probucol	Reduce la oxidación de lipoproteínas
Salicilatos	Antiinflamatorios, cortan reacción de cadena de RL
21-aminoesteroides	Potente inhibición de peroxidación ferrodpendiente
Manitol	Eliminación de radicales hidroxil
Dimetilsulfósido	Eliminación de radicales hidroxil
Dimetilurea	Eliminación de radicales hidroxil
Otros	Múltiples sustancias. ¿Escasa concentración in vivo?
<i>Inhibidores de la xantinoxidasa</i>	
Alopurinol, oxipurinol	Inhibición de la xantinoxidasa + actividad antioxidante
<i>Inhibidores de neutrófilos y macrófagos</i>	
De NADPH oxidasa	Inh. Superóxidos: adenosina, AINEs, calcio antagonistas
Suero antineutrófilos	Destrucción de neutrófilos circulantes
Agentes antiadhesión	Ac monoclonales frente CD11/CD18 Antagonistas de la act. plaquetaria

**Tabla I.13. Antioxidantes naturales y sintéticos (Maxwell).**

Según su mecanismo de acción podemos clasificar los antioxidantes:

<i>Tipo del sistema de defensa</i>	<i>Mecanismo de acción</i>	<i>Nombre del antioxidante</i>
Antioxidantes de prevención	Suprimiendo la formación de RL.	-Catalasa, glutatión peroxidasa y S-transferasa. -Transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina. -Superóxido dismutasa, carotenoides.
Antioxidantes eliminadores de radicales	Removiendo radicales al inhibir el inicio de la cadena y romper la propagación de la cadena.	-Lipofílicos: ubiquinol, vitaminas A y E, carotenoides. -Hidrofílicos: ácido úrico, ácido ascórbico, albúmina, bilirrubina.
Enzimas de reparación y de “novo”.	Reparan los daños y reconstituyen la membrana	Enzimas de reparación del ADN, proteasas, transferasas, lipasas.

**Tabla I. 14. Antioxidantes según su mecanismo de acción en el organismo.**

La producción de RL es un fenómeno natural, dinámico y continuo. El daño potencial que estos compuestos pueden ocasionar depende del estrecho equilibrio con los sistemas antioxidantes que protegen a las células del organismo. Se trata en definitiva de una síntesis de fuerzas que dará como resultado la supervivencia de la célula, su alteración génica o la apoptosis. Los mecanismos de defensa para neutralizar los RL y EROs son múltiples y variados. Existen varias clasificaciones de las defensas antioxidantes que exponemos a continuación:

***a. Defensas antioxidantes primarias y secundarias.***

Las primarias previenen el fenómeno oxidativo impidiendo la formación de los

RL o eliminándolos. Aquí se incluyen **la vitamina E** presente en la fracción insaponificable del **aceite de oliva virgen extra**, el ácido ascórbico, beta-caroteno, ácido úrico y algunas enzimas como superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa, catalasa y DT-diaforasa.

La función de las secundarias no es ser protectoras o eliminadoras del agente oxidante, sino que su papel sería el de eliminar los productos nocivos formados, impidiendo su acumulación. En este grupo encontramos a las enzimas de reparación del ADN, exonucleasas y endonucleasas, enzimas proteolíticas (proteasas y peptidasas), enzimas lipolíticas (fosfolipasa A2) y transferasas. Excepto los sistemas de reparación del ADN, los restantes enzimas lo que hacen es metabolizar los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos que han sido dañados por los RL/ERO. Dichas biomoléculas dañadas ya no cumplen su función biológica y su permanencia los convertiría con toda probabilidad en agentes nocivos.

#### ***b. Defensas antioxidantes en función de su mecanismo de acción.***

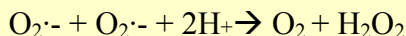
Están constituidas por antioxidantes de prevención, antioxidantes eliminadores de radicales y sistemas enzimáticos de reparación o síntesis de novo. Entre los sistemas enzimáticos relevantes (*Halliwell y Gutteridge, 1998; Quiles, J., 1995*) cabe citar los siguientes:

#### **3.1. Mecanismos antioxidantes enzimáticos o de producción endógena.**

Son enzimas con capacidad antioxidante que no se consumen al reaccionar con los radicales libres, y son dependientes de ciertos cofactores generalmente oligoelementos metálicos tales como cobre, hierro, magnesio, zinc o selenio.

##### **3.1.1. Superóxido dismutasa (SOD).**

Es un grupo de metaloproteínas, caracterizadas por la presencia de manganeso en las mitocondrias o de zinc-cobre en el citosol, que cataliza la reacción de formación de peróxido de hidrógeno a partir del oxígeno y el hidrógeno como se representa en la siguiente ecuación química:



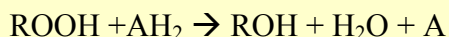
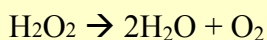
Las concentraciones en plasma son muy bajas o nulas. Su concentración mayor parece encontrarse en los sitios donde puede producirse oxígeno. La familia de las superóxido dismutasas (SOD) ha ido en aumento y ya se han descubierto al menos tres miembros además de las dos proteínas inicialmente detectadas (la Mn SOD mitocondrial y la Zn/Cu SOD citoplasmática, que dan cuenta del 100% de la actividad SOD intracelular), la Esc-SOD es de localización extracelular. La distribución de la SOD es muy amplia a nivel tisular, con excepción de la Mn-SOD, que no se localiza a nivel eritrocitario; todas ellas ejercen un importante papel en el control de los niveles de radical superóxido a nivel celular (*Monte M, 1994*).

### 3.1.2. Catalasa.

Se trata de una enzima ferroporfirínica intracelular, cuya localización principal son los peroxisomas (80%) y el citosol de las células, aunque también está presente en las mitocondrias y otros orgánulos (*Nieto, N., 1993*). La concentración de catalasa varía en las diferentes localizaciones celulares, y entre los diferentes tejidos del organismo, siendo su concentración baja o ausente en plasma (*Ramon, JR., 1993*), en tanto que abunda y es muy activa tanto en hígado como a nivel eritrocitario (*Nieto, N., 1993*).

Sin embargo, puede ser el antioxidante celular más importante cuando se escapa de las células necrosadas, autolimitando la extensión del daño por RL. Ejerce su acción sobre el peróxido de hidrógeno de forma muy eficaz. La función de la catalasa es doble: por un lado cataliza la descomposición de peróxidos de hidrógeno en agua y oxígeno, en tanto que también ejerce una función peroxidica, produciendo la oxidación de donadores de hidrógeno como el metano, los fenoles o el etanol con consumo de peróxidos como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Aebi H, 1984*):





El predominio de la reacción catalítica o peroxídica depende tanto de la concentración de peróxido de hidrógeno en el sistema como de la concentración de donadores de hidrógeno. La descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por parte de la catalasa es bastante rápida, sin embargo, su afinidad por el mismo es baja, por lo que se requieren altas concentraciones para su descomposición (Monte M, 1994; Casado, A., López-Fernández, ME., 2003).

### 3.1.3. Glutation peroxidasa.

Cataliza la reacción de los hidroperóxidos con el glutatión reducido (GSH) para formar glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de la reducción del hidroperóxido:



El enzima contiene Selenio, probablemente en el centro activo. Es específica para GSH y no para el hidroperóxido. Esta clara falta de especificidad de sustrato aumenta su capacidad de acción. En el estado estable se requiere la regeneración del GSH por la reducción del GSSG. La GSSG reductasa, dependiente del NADPH, tiene una distribución subcelular similar a la de la glutatión peroxidasa. La oxidación del NADPH une la acción de la glutatión peroxidasa con los sustratos unidos a NADPH. En situaciones de estrés oxidativo la actividad peroxidasa la realizan las glutatión transferasas, con aumento de la actividad peroxidasa y disminución de la actividad transferasa (Warholm, M., et al, 1985; Aniya, Y., et al, 1993).

### 3.1.4. Glutation reductasa.

Es una flavoproteína que cataliza la reducción de NADPH que depende del disulfuro de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). La reacción es esencial para el mantenimiento de los niveles de glutatión. Esta molécula tiene un

importante papel como reductor de los procesos de óxido-reducción, actuando también en los procesos de detoxicación y en otras funciones celulares de gran importancia. La actividad de esta enzima permite mantener los niveles de GSH para la acción de la glutatión peroxidasa. Es beneficioso, por tanto, un elevado balance GSH/GSSG para el mantenimiento de la salud, ya que así se promueve la detoxificación del peróxido de hidrógeno y de otros agentes tóxicos externos. N-Acetilcisteína (NAC) y otros compuestos con puentes sulfhidrilos (penicilina, captopril...) pueden actuar como antioxidantes al contribuir a la síntesis de glutatión y aumentar la eliminación de los RL.

### **3.2. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.**

Son compuestos principalmente exógenos teniendo como característica que se consumen durante su acción antioxidante, por lo que deben ser reemplazados. Proviene fundamentalmente de la dieta. Como antioxidantes de bajo peso molecular no enzimáticos están las vitaminas E y C, el beta-caroteno, el ácido úrico, la ceruloplasmina, la transferrina, la taurina, el dimetilsulfóxido (DMSO), la dimetilformamida (DMFO), quelantes de metales pesados, taninos, alcaloides del *Gingko biloba*, selenio, lactoferrina, tioxantina, hidroxantina (atrapador del radical OH), los ácidos nordihidroguayarático y tiazolidincarboxilo, etc.

1) Vitamina E (alfa-tocoferol). Está presente en el aceite de oliva virgen y es el antioxidante de membrana más eficaz que se conoce, protegiendo a la misma del daño peroxidativo. La vitamina E, después de haber sido oxidada y antes de descomponerse, puede ser reducida de nuevo por el ácido ascórbico y el glutatión, entre otros. La función fisiológica más aceptada de la vitamina E es su papel como "scavenger" de los radicales libres, previniendo la lesión oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados y de las proteínas ricas en grupos tiol de las membranas celulares, preservando así la integridad estructural y funcional de los orgánulos. Se considera el antioxidante natural más efectivo (*Burton, GW., 1992*), cuya función se ha demostrado tanto "in vivo" como "in vitro" (*Liebler, DC., 1993*). En 1968, Tappel publicó un artículo en el que sugería que el ácido ascórbico podría reducir los radicales tocoferoxilo formados durante el "scavenging" de los radicales libres formados in vivo durante el metabolismo, lo que permitiría a una molécula de

tocoferol limpiar muchos radicales y unirse a la vitamina C para la protección de las membranas contra el daño producido por los radicales libres.

La vitamina C ayuda a mantener los niveles de vitamina E ya que prevendría de la pérdida oxidativa de los alfa-tocoferoles en la comida durante el proceso de la digestión. Ella ascorbato también podría afectar la distribución del tocoferol disponible en el organismo.

Existe una relación inversa entre la tasa de vitamina E y en sangre y la tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica en poblaciones diferentes países europeos (Gey, 1991), estando España en los niveles menores de mortalidad asociados a la mayor tasa de vitamina E plasmática. La vitamina E activa la reducción del citocromo C y reduce el NADH, aunque no está claro que pueda ser metabolizada por la cadena respiratoria. Disminuye la fluidez de la membrana y altera la permeabilidad al fosfato. Puede afectar la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos y por tanto el metabolismo de AMPc, previniendo la peroxidación del ácido araquidónico a Pgs.

En células aisladas la vitamina E aumenta el nº de divisiones celulares de los fibroblastos en cultivo. Cuando además las células aisladas están sometidas a estrés ambiental o a algunas concentraciones de oxígeno, el alfa-tocoferol disminuye el depósito de lipopigmentos, al igual que la producción de malondialdehido (MDA). En animales primitivos, como celentéreos, anélidos,...etc, la vitamina E disminuye el depósito de lipofucsina (en experimentos llevados a cabo con nematodos de edad avanzada) aumentando su esperanza de vida en un 17%. Igualmente, el alfa-tocoferol aumenta la forma física de las *Drosophila* mayores.

2) Ubiquinona (Coenzima Q). Puede actuar como bloqueante de los RL, además de su papel en la cadena respiratoria mitocondrial. Los mecanismos aceptados por los que el CoQ puede actuar como antioxidante son previniendo la peroxidación lipídica o la propagación de la reacción en cadena.

3)  $\beta$ -Carotenos. Actúa como agente fotoprotector frente a los efectos deteriorantes de la luz, del oxígeno y de los pigmentos fotosensibilizadores. La actividad antioxidante de

estos compuestos se basa en su capacidad para reaccionar con determinados radicales libres, como el peróxilo, el hidroxilo, el oxígeno singlete, el anión superóxido, el ácido hipocloroso y otras especies reactivas (*Handelman, G.J., 1991*).

4) Ácido ascórbico. Actúa como un potente agente reductor ya que reduce radicales libres derivados del oxígeno, del nitrógeno y del sulfuro. Es un antioxidante soluble en agua que reacciona directamente con el radical superóxido, hidroxilo y con el singlete de oxígeno. En combinación con hierro o cobre puede acelerar su formación a través de la reacción de Fenton. Hay que resaltar que a pesar de su importante acción como antioxidante, resulta paradójico que el ascorbato pueda en ciertas condiciones generar los mismos radicales activos que en otras situaciones destruye actuando entonces como prooxidante. El ácido ascórbico puede sufrir de manera rápida y consecutiva dos procesos oxidativos monovalentes, con formación de radical semidihidroascorbato como intermediario, que no es muy reactivo y puede interaccionar de forma directa con radicales superóxido, hidroxilo y oxígeno singlete, así como radicales lipídicos y otros centrados en el nitrógeno y el sulfuro (*Buettner GR, Jurkiewicz, B.A., 1991*). Por otro lado, también es capaz de ejercer un papel antioxidante de manera indirecta, mediante la regeneración del alfa-tocoferol.

5) Otros antioxidantes. En los últimos años se están descubriendo numerosos compuestos antioxidantes de interés biológico, como el glutathion (tripéptido formado por cisteína, glicina y glutamina). La acción antioxidante de la mayoría de éstos se conoce *in vitro*, quedando por determinar su acción real *in vivo*. Entre las moléculas proteicas no enzimáticas de localización plasmática se conocen las siguientes: ceruloplasmina, transferrina, albúmina, haptoglobina, y hemopexina. Existe un grupo de pequeñas moléculas no enzimáticas y de pequeño peso molecular como el ácido úrico, bilirrubina, licopeno, luteína, zeoxantina, polifenoles, vitamina K, etc.

### **3.3. Melatonina.**

La melatonina (5-metoxi-N-acetil-triptamina) está presente en organismos tan alejados filogenéticamente como las algas y los humanos lo que sugiere que es una molécula altamente conservada a lo largo de la evolución (*Poeggeler B, et al, 1991*). En

vertebrados es segregada por la **epífisis** o glándula pineal mayoritariamente, localizada en el centro del encéfalo. Se trata de una estructura circunventricular, próxima al tercer ventrículo cerebral y fuera de la barrera hematoencefálica. Actualmente, se ha demostrado la síntesis de melatonina por otras células y tejidos. Esta indolamina es producida por también por la retina, el timo, linfocitos B, hígado y, sobre todo en el intestino, y posiblemente otros órganos. También ha sido encontrada en invertebrados, bacterias, organismos unicelulares incluso plantas. (Reiter, R.J., et al, 2003).

La distribución orgánica de la melatonina se corresponde con la localización de las células argentafines productoras de serotonina. La melatonina de origen extrapineal pasa a la circulación, aunque la sintetizada en la retina y en el tracto gastrointestinal pueden actuar allí. El 95% de la melatonina liberada a la sangre es metabolizada por el hígado. En el SNC la melatonina es rápidamente oxidada hacia N-acetil-5-metoxikinurenamina, sustancia que supone un 15% del total de los metabolitos urinarios de la hormona. La vida media de la melatonina tiene unos valores que fluctúan entre los 20 minutos a los 45-60 minutos.

Su producción muestra variaciones a lo largo del día vinculadas al ciclo circadiano generado por un “reloj” o marcapasos interno situado en el hipotálamo, que es el **núcleo supraquiasmático (NSQ)**, el cual está sincronizado con el ciclo luz-oscuridad durante las 24 h del día (Moore RY, 1978). Es un ciclo que influye de forma decisiva en los seres vivos ya que determina sus actividades vitales y comportamiento. En la Naturaleza los fenómenos biológicos que acontecen en los distintos niveles de organización suceden siguiendo ciclos regulables en una compleja interrelación de unos con respecto a otros.

El descubrimiento de la melatonina se debe al dermatólogo Aaron Lerner (1958) (Lerner AB, et al, 1958), que descubrió las hormonas melanocito estimulante y  $\beta$ -MSH que oscurecían la piel y buscaba una molécula que pudiera aclarar la piel. La molécula por derivarse de la serotonina y por referencia a la melanina la denominó melatonina.

Su estructura química es indólica derivada de la serotonina a partir del Triptófano y es la siguiente:

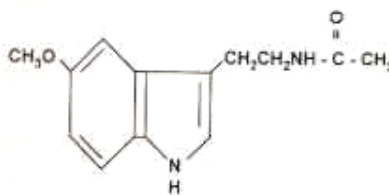


Figura 1.3. Estructura química de la 5-metoxi-N-acetil-triptamina o melatonina.

#### ● Biosíntesis.

La biosíntesis de la melatonina se rige por una vía multisináptica cuyo origen está en la retina, y por medio del tracto retino-hipotalámico accede al NSQ del hipotálamo, para posteriormente alcanzar la epífisis. La actividad secretora de la glándula pineal y su relación con el fotoperíodo requieren la integridad de esta inervación. La producción de melatonina es inhibida por la luz. A que a medida que se sintetiza es liberada a la circulación, por lo que sus niveles plasmáticos son un buen indicador de su producción. La mayor parte de la melatonina circulante es excretada por la orina en forma de compuestos sulfatados como el catabolito 6-sulfatoximetatonina (6-SMT) que resulta de su catabolización en el hígado. Sólo una pequeña porción será eliminada de forma libre. Su biosíntesis sufre diversas variaciones por las hormonas circulantes (Matuszak, Z, et al, 1997), (Muñoz-Hoyos A, et al, 2002) que regulan la producción de melatonina como la N-acetil-transferasa, cuya acción reguladora de la secreción de N-acetil serotonina también está documentada (Brownstein, M., et al, 1972), así como por la Hidroxiindol-O-metiltransferasa, que influye en la velocidad de síntesis de la aMT, y la MonoAminoOxidasa (MAO) (Escames, G., et al, 2002).

#### ● Secreción de la melatonina a lo largo de la vida.

La secreción de melatonina varía a lo largo de la vida de la siguiente forma: Durante los primeros seis meses de vida, los niveles nocturnos de melatonina son bajos, entre los 1 a 3 años alcanzan un pico nocturno y tienen ritmicidad circadiana. Entre los 15 y 20 años ocurre una caída en los niveles del 80 % debida probablemente al

incremento de la talla del cuerpo, a pesar de la producción constante de melatonina después de la infancia. Durante las décadas siguientes disminuyen moderadamente hasta los 70-90 años (*Waldhauser F, et al, 1988*).

#### ● Factores implicados en la disminución de la melatonina con la edad.

El descenso en la producción de melatonina durante el envejecimiento puede ser consecuencia de las alteraciones relacionadas con la edad en los sistemas neuronales cerebrales que regulan la actividad pineal que está regulada por el NSQ, considerado el “reloj biológico” tanto para la epífisis como para otros ritmos neuroendocrinos. El NSQ recibe mucha información procedente de diferentes sistemas nerviosos cerebrales siendo los más importantes las informaciones serotoninérgicas que se originan en los núcleos de Rafe del tallo cerebral así como fibras catecolaminérgicas del tallo cerebral que terminan en el NSQ. Cualquier alteración en estas vías repercutirá en la síntesis de melatonina desde la glándula pineal. Otras posibles causas son la alteración de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, calcificación de la glándula pineal, descenso del número total de pinealocitos, alteraciones en la tasa de aclaramiento de melatonina, déficit en la vía de utilización de 5-hidroxytriptófano o menor frecuencia de potenciales de acción durante la noche, hallazgos todos ellos encontrados mediante estudios realizados en rata hámster y hombre.

#### ● Capacidad antioxidante de la melatonina.

La melatonina tiene múltiples acciones como un antioxidante actuando como un protector celular. Existen evidencias que indican que la melatonina tiene **capacidad antioxidante**, es decir, que atrapa radicales libres. La actividad antioxidante de la melatonina se realiza a todos los niveles de la célula (membrana, citosol, mitocondria y núcleo). La melatonina al ser muy lipofílica, atraviesa todas las membranas celulares, además de las barreras hematoencefálica y placentaria. Las funciones de la melatonina como un antioxidante incluyen:

- a) Atrapa directamente radicales libres.
- b) Estimula la actividad de enzimas antioxidantes, mediante la regulación de la

- c) expresión génica de determinados enzimas de oxido-reducción.
- d) Incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial y reduce el escape de electrones.
- e) Aumenta la eficiencia de otros antioxidantes.

Pueden existir otras funciones de la melatonina, todavía no descubiertas. Numerosos estudios tanto in vitro como in vivo informan de la disponibilidad de concentraciones tanto fisiológicas como farmacológicas de melatonina que protegen contra el daño oxidativo de los radicales libres. (Reiter, R.J., et al, 2003).

*Hardeland* plantea la posibilidad de que la producción circadiana de melatonina ocurra como papel antioxidante (Hardeland, R. et al, 1995). La capacidad de eliminación de radicales hidroxilo se debe a su estructura química; concretamente, estriba en el grupo metilo en posición 5 –OH del anillo indol, mientras que el grupo N-acetil ejerce una acción sinérgica (Tan, D.X, et al, 1993) con las vitaminas C y E. Se ha evidenciado la acción antioxidante de la melatonina frente a otros radicales, concretamente los radicales peróxido (Pieri, C et al, 1994; Scaiano, J.C, 1995) y el singlete de oxígeno. (Reiter, R.J., et al, 1995; Acuña-Castroviejo, D., et al, 1995).

En todos los modelos experimentales conocidos la melatonina mostró capacidad de agente antioxidante (Pierrefiche, G. et al, 1995), como en los siguientes estudios:

- Previno completamente la lesión oxidativa mitocondrial causada por la proteína  $\beta$ -amiloide marcador neuropatológico del Alzheimer.
- Disminuyó la peroxidación lipídica de corteza cerebral y diencéfalo así como la ulcerogénesis de mucosa gástrica desencadenada por malondialdehído.
- Evitó la necrosis tubular con su poder antioxidante y restauró la actividad enzimática antioxidante en riñón de rata, tras el tratamiento con gentamicina la cual aumenta la lipoperoxidación.
- Redujo la peroxidación lipídica de hígado, pulmón, ileón y riñón de rata, tras la exposición a zimosano, agente no bacteriano que produce inflamación a través de las especies reactivas de oxígeno. (Melchiorri D, et al, 1994).
- Disminuyó el daño en la capa celular piramidal del hipocampo de rata, tras la



exposición al ácido quinolénico que desencadena daño neuronal.

- Disminuyó significativamente la peroxidación lipídica en bazo y plasma de rata tras una sobredosis de hierro o fosfina, desencadenadores de la peroxidación lipídica.
- Protegió al pulmón y riñón de rata contra el efecto carcinógeno potencial, daño al ADN y lípidos de membrana que desencadena el ácido D-aminolevulínico.
- La melatonina contrarresta el crecimiento del tumor mamario inducido por el estrés del ejercicio en ratas, retornando las concentraciones de prolactina y adrenalina a sus óptimos niveles fisiológicos (*Saez, M.C., et al, 2006*).

La melatonina es liposoluble por lo que cuando se administra por cualquier vía es absorbida rápidamente pudiendo atravesar todas las barreras biológicas, parece que puede llegar hasta cualquier parte de la célula previniendo el daño oxidativo.

Tanto el estado antioxidante total (EAT) del organismo como el ritmo de melatonina muestra variaciones diurnas en personas de entre 2-89 años, llegando los valores pico a las 1:00 h. Cuando se exponen los individuos a la luz por la noche, disminuyen claramente EAT y el nivel de melatonina. Los niveles nocturnos de melatonina son más elevados y el EAT muestran los niveles más altos durante las cuatro primeras décadas de la vida, disminuyendo posteriormente. En personas de 60 años las diferencias en cuanto día/noche se ven disminuidas en más de un 80 % y en personas aún mayores las diferencias desaparecen (*Waldhauser F, et al, 1988*). Además se sabe que la glándula pineal en lactantes y personas jóvenes tiene anatómicamente un mayor desarrollo y que disminuye su tamaño con la edad lo que está en consonancia con los estudios que demuestran que va disminuyendo sus niveles al avanzar la edad. La melatonina debe ser tenida en cuenta como agente protector del envejecimiento. Además interviene en la sincronización de un gran número de ritmos biológicos endocrinos y no endocrinos (reproducción, sueño-vigilia, actividad locomotora).

Potencia la respuesta del sistema inmune. Su acción se realiza a través de los linfocitos T-helper. Regula la actividad cerebral, sincronizando la actividad neuronal al fotoperiodo, ejerciendo una influencia inhibidora sobre el sistema nervioso central, con efectos analgésicos y ansiolíticos similares a los producidos por las benzodiazepinas a través de su interacción con receptores del complejo GABA-benzodiazepinas y probablemente con receptores de péptidos corticotropos y opioides. Los efectos anticonvulsivos y depresores del sistema nervioso central realizados por la

melatonina pueden depender de su actividad antioxidante.

### ● Consumo de melatonina.

En la actualidad la melatonina es consumida en algunos países para los problemas de insomnio, para el “jet-lag” y en ocasiones para ralentizar el envejecimiento. En España, la melatonina es un producto de investigación clínica, sin embargo en otros países se puede adquirir como suplemento en tiendas de dietética. La dosis de administración de melatonina oscila desde 0,5 a 3 mg, debiendo ingerirse normalmente una hora antes de acostarse. Tiene una vida media corta, entorno a los 40-50 minutos. Las concentraciones en suero alcanzan el pico a los 20 minutos y después caen rápidamente. Serán necesarios más estudios científicos para poder tener la seguridad de poder utilizar la melatonina con el fin de paliar los efectos del envejecimiento.

### 3.4. Coenzima Q<sub>10</sub>.

Se le conoce también como ubiquinona. Fue nombrada así por el investigador británico R. A. Morton. La razón es que la coenzima Q<sub>10</sub> es ubicua (existe en todas partes) en donde hay vida. Es una benzoquinona, es decir, un miembro de un grupo de compuestos orgánicos cíclicos. En su estructura química podemos observar que presenta en la posición 6 una cadena lateral constituida por un número variable de unidades isoprenoides y se detalla en la siguiente figura:

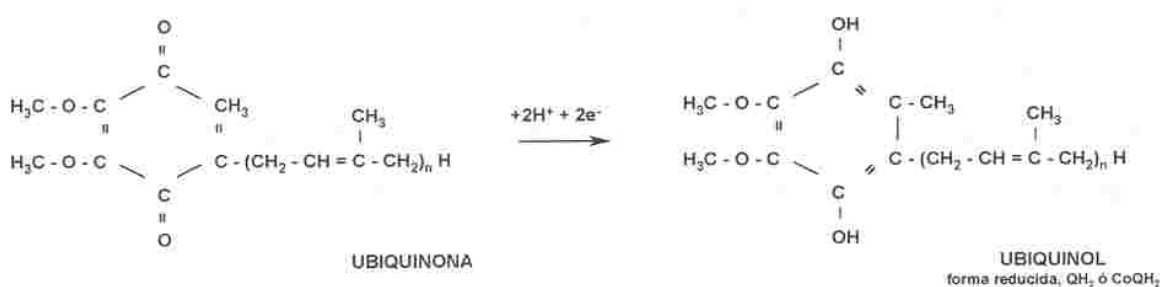


Figura I. 4. Estructura química de la Ubiquinona o Coenzima Q<sub>10</sub>.

Las coenzimas son moléculas indispensables para que se lleven a cabo muchas reacciones enzimáticas en el cuerpo. Nuestro cuerpo obtiene la coQ<sub>10</sub> a través de la dieta

y por transformación de otras coenzimas.

Se encuentra en las membranas de las mitocondrias siendo su función principal la de ejercer como *transportador móvil* en la cadena mitocondrial de transporte de electrones, transfiriéndolos desde los complejos tipo deshidrogenasa al complejo III, y por lo tanto, interviniendo en la producción de ATP, la molécula de energía básica de las células durante la respiración celular aeróbica.

A esta función como un transportador de protones y electrones en la cadena mitocondrial se suma que actúa como *un antioxidante* en su forma reducida (ubiquinol) inhibiendo la peroxidación lipídica en las membranas biológicas y protegiendo a las proteínas intermembrana mitocondriales y al ADN contra el daño oxidativo, por lo que actúa protegiendo a las células contra los radicales libres. Su actividad antioxidante fue observada, primeramente, por Mellors y Tappel, que demostraron una eficaz inhibición de la lipoperoxidación por ubiquinol-6 (Mellors, A, Tappel A.L., 1966).

Después de este estudio inicial se relizaron otros en los que se demostró la interacción directa del coenzima Q10 con radicales libres, reduciéndose la oxidación de lípidos en liposomas, membranas, células y lipoproteínas (Ernster, L., et al, 1992). Se pensaba que tanto la forma oxidada del coenzima Q10 (ubiquinona) como la reducida (ubiquinol, CoQH<sub>2</sub>), desempeñaban los mismos efectos antioxidantes, aunque en estudios posteriores se demostró que se necesitaba una elevada concentración de ubiquinonas para observar una acción antioxidante significativa (Landi, L. et al, 1990), encontrándose que la forma reducida o ubiquinol tenía mayor capacidad para inhibir la lipoperoxidación inducida (Kagan, V.E. et al, 1990).

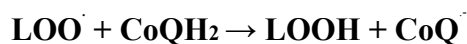
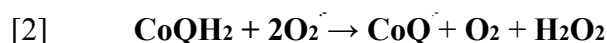
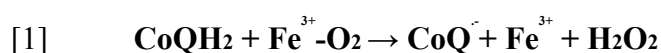
#### **-Mecanismos de actuación antioxidativa del coenzima Q10:**

El mecanismo antioxidativo más utilizado es el del mantenimiento del *pool* de vitamina E mediante la reducción del radical  $\alpha$ -tocoferoxilo. La constante de interacción ubiquinol-radical tocoferoxilo es mucho más alta que la constante de reacción con el radical peroxilo, por lo que existe una mayor afinidad por reducir  $\alpha$ -tocoferoxilo que por interaccionar con los radicales peroxilo (Mukai, K., et al, 1993).

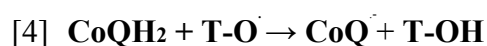
De los estudios realizados se extraen varios mecanismos de actuación antioxidativa:

a) Reducción directa de especies perferrilo ( $\text{Fe}^{3+} - \text{O}_2^{\cdot}$ ) por  $\text{CoQH}_2$  [1], con la consecuente prevención del ataque de estas especies, considerándose este mecanismo como inhibidor de la síntesis de radicales alquilo y peroxilo.

b) Interacción directa con anión superóxido [2] y con radicales alquilo y peroxilo, mediante donación de átomos de hidrógeno a estos radicales [3] (*Litarru, G.P., 1994; Kagan, V.E. et al, 1995*).



c) Regeneración de  $\alpha$ -tocoferol [4].



d) Actuación del  $\text{CoQH}_2$  sobre la formación de ferril mioglobina (forma radical), producto formado en la interacción de mioglobina con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , potente agente oxidante capaz de agredir diversos componentes celulares. En estudios in vitro se muestra que la adición de ubiquinol reduce estos compuestos y por lo tanto su daño, regenerándose la forma oxidada de CoQ. Por tanto, este mecanismo antioxidante que lo involucra en el daño por isquemia-reperfusión presentaría una doble ventaja: disminución de un radical y regeneración de ubiquinona (*Litarru, G.P. et al, 1995*).

e) La posible inducción de DT-diaforasa, un enzima que convierte a las quinona en hidroquinonas, más que en semiquinonas, preveniendo así su posterior autoxidación, podría convertirse en otro mecanismo antioxidante (*Lind, C. et al, 1982*).

En conclusión, esta coenzima es asimismo utilizada por el cuerpo como si se tratara de un antioxidante endógeno, que protegería a las células de la acción nociva de los radicales libres, capaces de dañar al ADN. Por tanto, se puede considerar un importante antioxidante endógeno liposoluble. (Kaikkonen, J. et al, 1997). Los mecanismos de acción antioxidante son: inhibición de la síntesis de radicales alquilo y peroxilo, mediante reducción directa de especies perferrilo (Figura I.5.); interacción directa con anión superóxido y con radicales alquilo y peroxilo, mediante la donación de átomos de hidrógeno (Kagan, V.E., et al, 1991; Litarru, G.P, 1994).

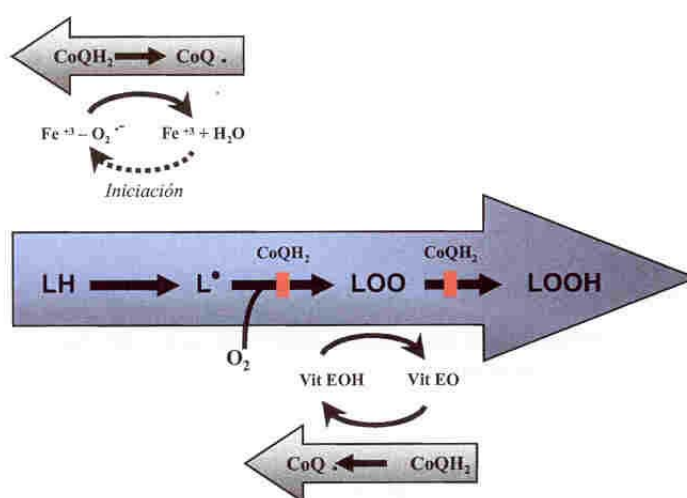


Figura I.5. Mecanismos antioxidantes del Coenzima Q<sub>10</sub>.

Los niveles de ubiquinona en los tejidos están sujetos a regulación por factores fisiológicos que están relacionados con la actividad oxidativa del organismo. Los niveles de ubiquinona incrementan bajo la influencia del estrés oxidativo, por ejemplo en el ejercicio físico intenso, la adaptación al frío, el tipo de grasa predominante en la dieta, tratamiento con hormonas tiroideas y disminuyen durante el envejecimiento (Albano, C.B, et al, 2002). La actividad antioxidante del ubiquinol (forma reducida) es independiente del efecto de la vitamina E, inhibiendo la propagación de la peroxidación lipídica. En adición, el ubiquinol puede mantener eficientemente el efecto de la vitamina E por regeneración de la vitamina, pero dependiendo de agentes hidrofílicos como el ascorbato (vitamina C). El ubiquinol es el antioxidante liposoluble que las células

animales pueden sintetizar de novo, para lo que existen mecanismos enzimáticos que pueden regenerar la forma antioxidante desde su forma oxidada. Su alto grado de hidrofobicidad y su existencia difundida en las membranas biológicas indican un importante papel del ubiquinol en las defensas celulares contra el daño oxidativo. (Ernster L, Forsmark-Andree P, 1993).

La suplementación en humanos con CoQ<sub>10</sub> (la coenzima oxidada), incrementa las concentraciones de CoQH<sub>2</sub> (ubiquinol, forma reducida, que es un potente antioxidante como he comentado con anterioridad) en plasma y aumenta la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la iniciación de su peroxidación. (Mohr D, et al, 1992).

En un estudio realizado para analizar el papel del coenzima Q<sub>10</sub> en la formación de radicales libres y como antioxidante se observó que el peróxido de hidrógeno puede actuar como un oxidante de la semiquinona. Los resultados de estudios posteriores indican la posibilidad de que la superóxido dismutasa puede interactuar con el ubiquinol. (Beber RE, 1992).

La concentración de coenzima Q<sub>10</sub> no es uniforme en el cuerpo. Hay células de ciertos órganos que contienen mucha más coQ<sub>10</sub> que otras. Existe mayor cantidad de esta coenzima en los órganos que requieren mayor cantidad de energía para poder funcionar adecuadamente como son el corazón y el hígado. A medida que una persona envejece, los niveles de coenzima Q se vuelven cada vez menores y sobre todo en situaciones de estrés continuo.

Entre las **propiedades** de la coQ<sub>10</sub> cabe destacar las siguientes:

- En procesos alérgicos a algunas personas les sirve de antihistamínico natural.
- Mejora nuestro tono vital ya que es esencial para la aportación de energía a cada célula. Además mejora la tolerancia al ejercicio físico en personas sedentarias, siendo ideal también para deportistas ya que es capaz de aumentar la tolerancia ante el esfuerzo.
- Fortalece el sistema inmune ya que incrementa la capacidad fisiológica de utilización del oxígeno sobre todo en situaciones de estrés y eso favorece la función de las células del sistema inmunológico. Parece ser también importante para fortalecer las defensas en

pacientes con cáncer.

-La coQ<sub>10</sub> es una buena aliada en los problemas cardíacos (angina de pecho, infartos, etc) ya que es uno de los nutrientes principales del tejido cardíaco favorece la oxigenación y combate los radicales libres. Hay que tener en cuenta que el corazón es un órgano muy activo que utiliza una gran cantidad de energía para llevar a cabo su actividad por lo que esta coenzima es esencial en su función. No es de extrañar, que sea frecuente observar en los pacientes cardíacos niveles inusualmente bajos de coQ<sub>10</sub>. En un estudio sobre el impacto de esta coenzima en la angina de pecho se comprobó que en los pacientes que fueron tratados con ella se reducían los episodios anginosos en un 53 %. Además el latido regular y la coordinación y la fuerza del mismo. Ha mostrado también su eficacia en las miocardiopatías, las insuficiencias cardíacas congestivas, la cardiopatía isquémica, el prolapso de la válvula mitral, las arritmias y la hipertensión.

-Puede ayudarnos a reducir el peso de manera natural. Las personas obesas y las que hacen dietas muy estrictas suelen presentar niveles bajos de co Q<sub>10</sub>.

-Incrementa la longevidad enlenteciendo el proceso de envejecimiento. Eso es debido a su poder antioxidante que neutraliza los radicales libres.

-Los pacientes con distrofia muscular parece que poseen niveles reducidos de co Q<sub>10</sub>. La suplementación con co Q<sub>10</sub> puede mejorar su calidad de vida.

-En los enfermos de Alzheimer la unión de la coQ<sub>10</sub> con el hierro y la vitamina B6 puede minimizar los síntomas de demencia y retrasar de forma progresiva la pérdida de memoria.

-También se ha mostrado eficaz en el tratamiento de la enfermedad periodontal, la parálisis de Bell, la sordera y el síndrome de fatiga crónica.

En estudios posteriores ha sido demostrada la relación de la ubiquinona con extensión de la peroxidación lipídica inducida por estrés, bien exógeno (adriamicina) o endógeno (ejercicio físico), observándose un aumento de los niveles de co Q<sub>10</sub> en las membranas lipídicas (*Mataix J, et al, 1997*).

En otros estudios se ha manipulado la grasa alimentaria de la dieta, de tal forma que el grado de grasa insaturada conducía a diferentes contenidos mitocondriales de Co Q<sub>9</sub> y Co Q<sub>10</sub>. La grasa monoinsaturada incrementa los niveles de CoQ<sub>10</sub> mitocondrial, mientras que la grasa saturada disminuye dichos niveles. El efecto combinado del ejercicio físico y la grasa de la dieta sobre los niveles plasmáticos y en

tejidos de CoQ<sub>10</sub> han sido también estudiados. Los niveles de Co Q<sub>10</sub> no cambiaron durante el ejercicio aeróbico cuando la grasa era monoinsaturada mientras que aumentaron ligeramente en el caso de utilizar grasas poliinsaturadas, sucediendo al contrario con el ejercicio anaeróbico. (Mataix J, et al, 1997).

Dada la importancia de este compuesto para la óptima producción de la energía celular, se comenzó a investigar si su utilización sería beneficiosa en enfermedades cardiovasculares y en el cáncer.

Entre las acciones del coQ<sub>10</sub> cabe destacar que estimula el sistema inmune. En diferentes estudios que se han realizado sobre bioquímica humana corporal, se ha descubierto que cuando los niveles de coQ<sub>10</sub> son deficientes en más del 25 % comienzan a aparecer una serie de enfermedades que pueden ir desde la hipertensión, problemas cardíacos, problemas de inmunodeficiencia y cáncer. Si esta deficiencia en los niveles de coQ<sub>10</sub> es mayor al 75 % la vida no puede continuar.

Hoy sabemos que la coenzima Q<sub>10</sub> es una parte integral del ciclo inmunológico. Cuando los niveles de coQ<sub>10</sub> están bajos, también la inmunidad está débil.

También se sabe de la importancia del Selenio en la producción normal de coQ<sub>10</sub>. Actúa como un agente estimulante para la activación de los macrófagos. Es inmunoestimulante, capaz de ayudar al buen funcionamiento de la inmunidad tanto humoral como celular. La estimulación inmunológica que es producida por la coQ<sub>10</sub> se obtiene por un mecanismo que es totalmente distinto al de algunas drogas inmunológicas, las cuales, a veces tienen riesgo de producir toxicidad. Muchos estudios realizados con la coQ<sub>10</sub> han sido publicados en Proceedings of the National Academy of Sciences.

Como conclusión podemos afirmar que la coQ<sub>10</sub> estimula la efectividad de sistema inmunológico pero no porque estimule la producción de un mayor número de células, sino porque induce más energía y de esta manera aumenta la inmunocompetencia de las células ya existentes.

### **3.5. *Phlebodium decumanum*.**

Las repercusiones que el ejercicio físico intenso tiene sobre el sistema inmunitario son la causa para estudiar los efectos de un inmunomodulador como parece serlo el *Phlebodium decumanum*. En el ejercicio se produce un estado inflamatorio que ocasiona



alteraciones en el sistema inmune. Los inmunomoduladores son sustancias que tendrían una actividad sobre la fisiología del sistema inmune en el organismo, comprenden un amplio grupo de productos y sustancias con diferentes actividades y efectos sobre las funciones del sistema inmune que en la mayoría de los casos no están perfectamente definidos.

Los inmunomoduladores que se considera que son potencialmente activos en la prevención o recuperación de las alteraciones del sistema inmune asociadas a la práctica del ejercicio físico intenso incluyen las inmunoglobulinas, el glicofosfopectal, el levamisol, las interleucinas y sus receptores solubles y los anticuerpos dirigidos frente a diferentes moléculas relevantes (Esteban Fernández E, 2004).

En este sentido, el empleo de *Phlebodium decumanum* se utiliza como inmunomodulador en situaciones de ejercicio físico intenso. (De Teresa C, 2003). Así, el uso de *Phlebodium* en la reversión del síndrome de sobre esfuerzo físico y de los efectos negativos del mismo ha demostrado que los atletas que lo utilizan mantienen un elevado nivel de esfuerzo evitando la aparición inmediata de efectos indeseables asociados a la fatiga. (Punzón, C. et al, 2001; Punzón, C., 2003).

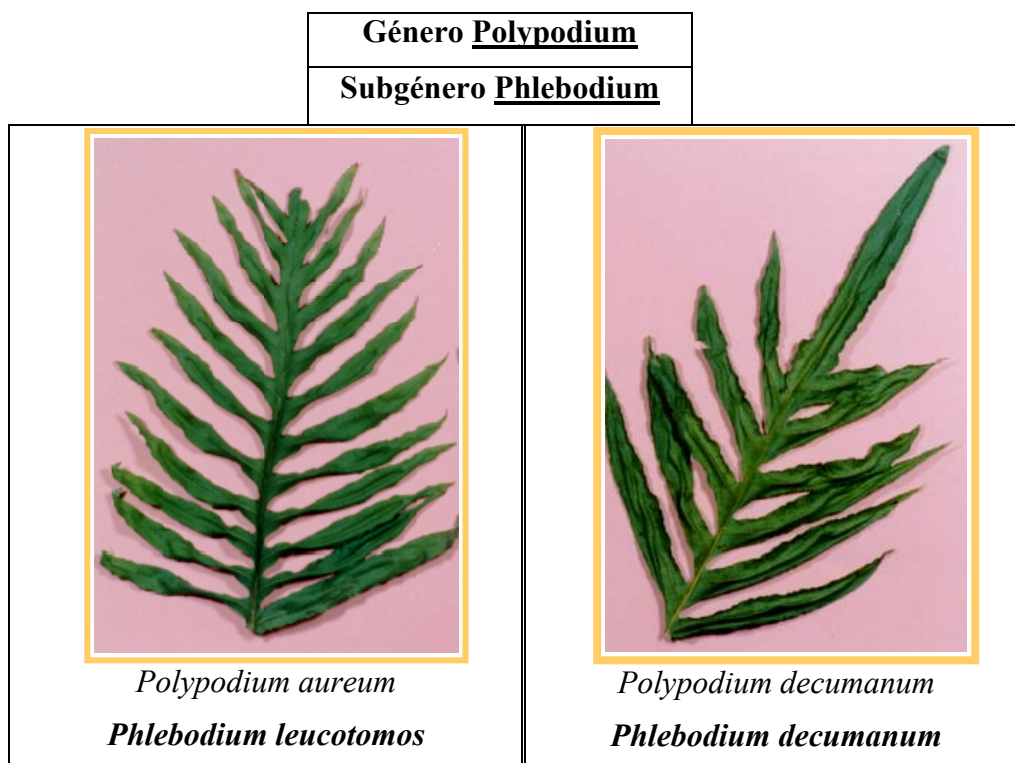
Por tanto, el *Phlebodium decumanum* es una especie de Pteridofita (helecho) con propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes con potenciales efectos protectores frente a los riesgos del sobre esfuerzo. Pertenece al grupo de las Polipodiáceas, aunque en América central y Sudamérica se utiliza el término “calaguala” para nombrarlas. La definición específica de estas plantas proviene del acuerdo unánime al que se llegó en 1992 sobre su nomenclatura y clasificación taxonómica. Este acuerdo se llevó a cabo por especialistas La Escuela Agrícola Panamericana de Honduras, por la Universidad de Uppsala de Suecia y por la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.



Fotografía I.1. Estas imágenes corresponden a dos fotografías de ejemplares de la especie *Phlebodium decumanum*.

Algunos de estos helechos, como el *Polypodium leucotomos*, tienen aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades en las que existen variaciones inmunes como ocurre con la psoriasis.

Las plantas de la especie *Phlebodium decumanum* se caracterizan por presentar un amplio fronde que tiene en su envés varios soros (3 a 7) y un rizoma (tallo subterráneo) de aspecto grueso y carnoso. Son cultivadas en la plantación del lago Yojoa en Honduras. Sin embargo, las plantas de la especie *Polypodium leucotomos* presentan como características anatómicas diferenciales unos frondes más cortos y estrechos con un único soro. Sólo en ésta plantación de la Yojoa se cultivan estas dos polipodiáceas, constituyendo un buen ejemplo de cultivos procesados orgánicamente y un importante aporte a la conservación de la Biodiversidad. En la siguiente ilustración se muestra esquemáticamente dos imágenes de las dos variedades de calaguala, específicamente del género *Polypodium* (Ilustración I.1.):



**Ilustración I.2.** En estas ilustraciones se nos muestran las diferencias morfológicas de los frondes de los dos subgéneros de *Phlebodium*.

A partir de una fracción hidrosoluble de fronde purificada y estandarizada se obtienen las formulaciones a base de *Phlebodium decumanum*. Esta fracción se obtiene por extracción hidroalcohólica de las frondes maduras, secas y trituradas, con posterior eliminación del disolvente orgánico, concentración de la fase acuosa y purificación. Los controles tanto físico – químicos como biológicos durante las etapas del proceso hasta conseguir el producto final señalan la requerida reproductibilidad lote a lote. Este exigente proceso sirve para diferenciarlo de otros extractos no estandarizados que pudieran haber sido obtenidos de plantas silvestres, sin una rigurosa identificación botánica y sin los controles de calidad y criterios de selección y recolección que se aplican a las plantas cultivadas.

Se pueden obtener formas líquidas (jarabes y cápsulas blandas) y formas sólidas (polvo, cápsulas duras y comprimidos), utilizando distintos excipientes a partir de esta fracción hidroalcohólica. La mezcla de extracto con rizoma esterilizado y triturado, una vez secada y homogeneizada da lugar a un polvo que puede utilizarse como tal o en forma de cápsulas.

El extracto de *Phlebodium* es capaz de mantener el estado redox celular, tras la sobrecarga de ejercicio físico. Este efecto debe suponer una mayor funcionalidad mitocondrial y sobre todo la prevención de modificaciones celulares propias del estrés oxidativo.

Hay estudios en los que deportistas sometidos a una actividad física intensa y que han consumido *Phlebodium* no les aparece la fatiga de forma inmediata manteniendo un nivel de esfuerzo constante y elevado.

Se han estudiado los efectos del *Phlebodium decumanum* sobre la reversión del síndrome de sobreentrenamiento y los efectos adversos del mismo (De Teresa C et al, 2003). Se estudió el efecto del *Phlebodium decumanum* en ciclistas sobre el rendimiento deportivo, la prevención del daño oxidativo y la disfunción inmune ligados al sobre esfuerzo físico. En este estudio, a pesar de la moderada intensidad del entrenamiento físico, los resultados mostraron una mejora significativa del rendimiento físico a nivel máximo (vatios, lactato, y cociente respiratorio máximos en cicloergómetro) y submáximos (reducción de la frecuencia cardíaca a nivel submáximo: 250 vatios) en comparación con el grupo placebo. Asimismo los resultados obtenidos sobre el daño oxidativo (ADN mitocondrial) y la disfunción inmune (IL-1, IL-6, TNF, TNF-rs, IL-1ra) son mejores en el grupo *Phlebodium* que en el grupo placebo. El uso de *Phlebodium* para en el tratamiento del síndrome de sobreentrenamiento y de los efectos adversos derivados del mismo, parece ayudar a que los deportistas que lo ingieren son capaces de mantener un nivel de esfuerzo alto durante más tiempo, y además no se observa la aparición de alteraciones del rendimiento causados por la aparición de la fatiga. Los efectos de este producto no son simplemente un aporte nutricional, sino que también tiene efectos reguladores de la respuesta inmunológica (Punzón, C., 2001; Punzón, C. 2003).

Por otra parte, las formulaciones de *Phlebodium* podrían actuar no sólo como suplemento nutricional sino regulando los niveles de TNF, según aportan los estudios llevados a cabo en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” del CSIC en Madrid, donde se ha demostrado la acción reguladora del *Phlebodium* sobre la liberación de TNF en modelos experimentales *in vitro*, ya que se admite una disfunción inmune caracterizada por la liberación de elevadas cantidades de TNF como consecuencia del sobre esfuerzo físico.

La acción inmunomoduladora del *Phlebodium decumanum* en modelos experimentales *in vitro*, ha sido estudiada por *Punzón y col.* (2001, 2003) en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, en cuyo estudio se concluyó que el *Phlebodium decumanum* tiene una acción reguladora de los niveles elevados de TNF $\alpha$ , cuando los macrófagos son estimulados por LPS y IFT $\gamma$  como consecuencia de un incremento de la liberación de receptores solubles (sTNF- R) que bloquean parcialmente (hasta un 80%) dichos picos de liberación de esta citoquina. (*Punzón C, 2001; Punzón C, 2003*).

El uso de *Phlebodium decumanum* en enfermos de SIDA se remonta a 1995 en Honduras. El Departamento de Riesgos Poblacionales del Ministerio de Salud en Honduras, trató pequeños grupos de adultos enfermos de SIDA, recuperando el apetito, el peso y la calidad de vida de estos pacientes. Estos resultados preliminares constituyeron la base de un estudio doble ciego llevado a cabo en El Instituto del Tórax de Tegucigalpa con la colaboración de la Universidad De Miami, School of Medicine.

Los resultados de estos estudios han sido presentados en el Congreso Centroamericano de VIH/SIDA celebrado en San Pedro Sula (Honduras), con el apoyo de importantes organismos internacionales, tales como ONUSIDA y UNICEF e instituciones como la propia Universidad De Miami, la agencia de Cooperación Española y los Ministerios de Salud de los países centroamericanos.

Un estudio de *González, J.A* (2003) afirma que tras someterse a un programa de acondicionamiento físico de un mes, el aporte de *Phlebodium* beneficia a sujetos no entrenados previamente de las consecuencias que el ejercicio físico ejerce sobre el daño y la fatiga muscular. Se llega a esta conclusión al observar mejoría respecto de valores iniciales de enzimas séricas como la CPK , la LDH y el cortisol. En concreto, los cambios de la CPK están cercanos a la significación estadística. (*González Jurado JA, 2003*). En este estudio también se evidencia que el aporte de *Phlebodium* parece tener claros efectos beneficiosos sobre el rendimiento por su acción sobre la fatiga, por lo que tendría un efecto ergogénico. (*González Jurado JA, 2003*). Además se observa que el aporte de *Phlebodium* parece tener un efecto inmunomodulador sobre la disfunción inmune provocada por el ejercicio físico al apreciarse una mejoría de valores de

biomarcadores de la función inmune (como es la IL-6, de la que se encontraron valores inferiores estadísticamente significativos) y de la respuesta inflamatoria secundaria.

En otro estudio se evidenció que la ingesta de *Phlebodium* en sujetos no entrenados en condiciones fatigantes a los que se les sometió a un programa de acondicionamiento físico, podría constituir una inmunoprotección frente al ejercicio físico, minimizando fundamentalmente los estados de inflamación ( *Esteban Fernández, E., 2004*).

De otro estudio con ratas de laboratorio sometidas a ejercicio extenuante a las que se les dio un aporte de *Phlebodium* se extrae como conclusión que se aprecian variaciones favorables en la actividad enzimática y en las concentraciones de oxidantes en quienes tomaban *Phlebodium* cuando se analizaron los efectos del daño oxidativo y la disfunción inmune (*Molina Sotomayor E, 2002*).

El profesor de Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard, Dr. González Rodríguez, realizó las siguientes declaraciones a Diario Médico (el 3 de Junio de 2004) en las que afirmaba que “el extracto de *Polypodium leucotomos* ha sido empleado en el tratamiento de trastornos dermatológicos como el vitilo, psoriasis y otros procesos inflamatorios, presentando una actividad fotoimmunoprotectora capaz de reducir el riesgo de desarrollar lesiones derivadas de la exposición a las radiaciones ultravioletas”. El jefe del servicio de Dermatología del Hospital de Santa Cruz y San Pablo de Barcelona, Dr. Alomar afirmaba que “el extracto de *Polypodium leucotomos* es capaz de proteger a las células de Langerhans, que son las células vigías de la epidermis, por lo que ayuda a mantener las defensas frente a las alteraciones inducidas por la luz solar”.

#### **4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE ESTUDIO.**

El interés por la relación entre inflamación y estrés oxidativo ha aumentado en los últimos años, ya que comparten un papel común en la etiología de una variedad de enfermedades crónicas. Durante el ejercicio, inflamación y estrés oxidativo están relacionados por el metabolismo y el daño muscular ya que se generan especies reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno. Por ello, se intenta buscar estrategias nutricionales

para reducir estos efectos como pueden ser los suplementos antioxidantes (Peaje, J.M., et al, 2006).

Por tanto, y de acuerdo con todas las justificaciones expuestas anteriormente, pretendemos medir en un grupo de deportistas no profesionales el efecto o repercusión que tiene la toma de determinados suplementos como son la melatonina, el coenzima Q<sub>10</sub> y el *Phlebodium decumanum* antes de la realización de una prueba de ejercicio físico intenso. Para ello, se harán mediciones mediante extracciones de sangre inmediatamente antes y después de la realización de la prueba.

#### **4.1. Objetivos generales.**

Consideramos que los objetivos a conseguir son los siguientes:

- Profundizar en el conocimiento del papel que el ejercicio físico posee como:
  - generador de radicales libres.
  - sobre el sistema inmune.
  - sobre el perfil bioquímico.
- Analizar y comparar las posibles implicaciones de la melatonina, coenzima Q<sub>10</sub> y *Phlebodium decumanum* como antioxidantes, en los fenómenos oxidativos derivados del ejercicio físico intenso, así como su hipotética acción de inmunomoduladores, y su influencia en el perfil bioquímico resultante.
- Cuantificar en qué medida el ejercicio físico programado contribuye al aumento de la calidad de vida debido a sus implicaciones en el envejecimiento y fomentar hábitos de ejercicio físico saludables.
- Valoración de la importancia de la práctica de la actividad física en una intensidad y frecuencia que aporten beneficios sobre el estado de salud del individuo.
- Prevención de las posibles modificaciones en el sistema inmune derivadas de la práctica de un ejercicio físico intenso.

#### **4.2. Objetivos específicos.**

Establecemos como objetivos específicos de nuestro estudio los siguientes:

- Determinación de parámetros en sangre (parámetros plasmáticos y determinaciones en eritrocito) antes y después de la prueba de ejercicio físico en los distintos grupos.
- Determinación de parámetros en orina antes y después de la prueba del ejercicio físico intenso en los distintos grupos.
- Comparación de los parámetros plasmáticos, eritrocitarios y urinarios correspondientes al estado inicial y estado final posterior al ejercicio físico intenso de los sujetos.

#### **4.3. Hipótesis.**

La hipótesis que planteamos sería la siguiente:

“El ejercicio físico intenso además de producir fatiga, induce estrés oxidativo que es causa de numerosas alteraciones en el organismo, y con la pretensión de la creación de hábitos físico-deportivos saludables, queremos demostrar que con el aporte de suplementos (melatonina, coenzima Q<sub>10</sub> y *Phlebodium decumanum*) que actuarían como factores modificadores del perfil inmuno-bioquímico se podrán minimizar las alteraciones del sistema inmune y contrarrestar las consecuencias negativas del daño oxidativo inducido por el ejercicio físico intenso ya que se presentan medidas más favorables en marcadores bioquímicos”.



## 1. MUESTRA POBLACIONAL.

Los individuos que han participado en este estudio son atletas no profesionales que se han seleccionado en cuatro grupos que han realizado la prueba de ejercicio físico anual de subida a Sierra Nevada desde la ciudad de Granada en el mes de Agosto (el 1-08-2004). Los cuatro grupos establecidos son: grupo melatonina, grupo coenzima Q<sub>10</sub>, grupo *Phlebodium* y un grupo placebo (control). Por tanto, cada grupo tomó vía oral un suplemento que pudo ser melatonina, coenzima Q<sub>10</sub>, *Phlebodium* o un placebo los días anteriores a una prueba de ejercicio intenso sin conocimiento previo por parte de los deportistas de qué tipo de suplemento tomaban para descartar una posible predisposición o influencia del factor psicológico.

Hemos establecido una serie de criterios de inclusión y de exclusión para elegir a una muestra representativa de la población.

### 1.1. Selección de la muestra:

*Criterios de inclusión de los sujetos experimentales:*

- a) Todos los deportistas habían realizado la prueba en años anteriores.
- b) Ser varones.

Para todos los grupos consideramos como *criterios de exclusión*, la presencia de alguna de las siguientes situaciones:

- a) Padecer enfermedades metabólicas manifiestas o generales crónicas o agudas.
- b) La presencia de fiebre o de que está cursando un proceso infeccioso.
- c) La ingesta de fármacos hepatotóxicos como el paracetamol.
- d) Para conseguir una estandarización de los individuos de la muestra no deben haber fumado desde unas horas antes; no han de realizar trabajo físico excesivo durante las horas previas y haber comido el día antes una dieta moderada.

Una vez finalizado el proceso de selección, la muestra de estudio quedó configurada de la siguiente manera: 3 grupos experimentales (2 grupos con de 8 sujetos cada uno y 1 grupo con 9 sujetos), más 1 grupo control de 9 corredores. En total participaron en el estudio 34 sujetos seleccionados. El grupo placebo (G.P) es el que no

recibe ningún suplemento y los otros 3 grupos experimentales si (G.M, G.C y G.F). En la siguiente tabla se especifica el reparto de la muestra en los grupos:

<b><u>GRUPOS</u></b>	<b>N</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad media</b>	<b>Tiempo invertido</b>
<b>Grupo Melatonina (G.M)</b>	8 corredores (falta el nº 3 antes y después)	Varones	39,25	5,34 h
<b>Grupo Coenzima Q (G.C).</b>	8 corredores	Varones	41,75	5,74 h
<b>Grupo Phlebodium (G.F)</b>	9 corredores (falta el nº 7 después)	Varones	37,56	5,94 h
<b>Grupo Placebo (G.P)</b>	9 corredores (faltan los números 6 y 8 antes).	Varones	42,08	5,59 h
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>	<b>Varones</b>	<b>40,16</b>	<b>5,65 h</b>

**Tabla II.1: Muestra detallada del estudio.**

Los grupos de partida eran de 12 participantes en cada grupo y hemos eliminado a atletas que no finalizaron la carrera, que tardan más de 6 horas, que tienen menos de 25 años o más de 40 años para hacer grupos lo más homogéneos posible dentro de la limitación de los participantes de este tipo de carrera.

Todos los participantes han participado en carreras anteriores (año anterior) y mantienen una actividad física diaria.

## **1.2. Valoración médica del adulto que realiza ejercicio físico.**

La inactividad física va asociada a diversas patologías (cardiopatía isquémica, hipertensión arterial, obesidad, diabetes mellitas tipo 2,...), (Ciurana R, et al,1994).

Por el contrario, existe evidencia del efecto preventivo que el ejercicio físico ejerce sobre la cardiopatía isquémica, la hipertensión arterial, la diabetes mellitas tipo 2, la obesidad, la osteoporosis, el cáncer de colon, la ansiedad y la depresión (Córdoba, R.

*et al*, 2001) y además, las personas que mantienen un estilo de vida físicamente activo o una buena forma física presentan menores tasas de mortalidad que las sedentarias y una mayor longevidad. (Salleras L, Serra L.,1991)

Teniendo en cuenta estas evidencias, debemos recomendar la práctica regular de un ejercicio físico que reúna las siguientes características de intensidad: (frecuencia cardíaca entre 60 y 85 % de la frecuencia máxima teórica, obtenida mediante la fórmula 220-edad en años), duración (mínimo 30 minutos por sesión) y frecuencia (mínimo tres días por semana) (Ciurana R., *et al*, 1994). Pero no debemos olvidar que la realización de un ejercicio físico supone un esfuerzo sostenido que puede tener repercusiones en el estado de salud del individuo, por lo que es muy importante realizar una valoración clínica del sujeto antes de iniciar una actividad deportiva (Navas FJ, Jiménez F.,1999).

El objetivo fundamental de esta valoración es reducir al mínimo los riesgos derivados de la práctica de ejercicio físico y conseguir los mayores beneficios posibles (Ortega R, Mainka J., 1996). Para ello se deben recoger los antecedentes fisiológicos y patológicos del individuo y hay que realizar una exploración física y algunas exploraciones complementarias para catalogar el estado de salud del sujeto y descubrir patologías que pudieran contraindicar el ejercicio físico (tabla I) o requerir precauciones especiales (tabla II.2.) para su práctica. (Salleras L, Serra L.,1991; Navas FJ, Jiménez F., 1999; Ortega R, Mainka J., 1996).

---

### **Contraindicaciones absolutas para la práctica de ejercicio físico.**

- Infarto de miocardio reciente.
- Angina inestable o de reposo.
- Arritmias: fibrilación auricular, taquicardia auricular paroxística, síndrome del nódulo sinusal enfermo, síndromes de preexcitación, bloqueos A-V de 2º y 3º grados.
- Insuficiencia cardíaca congestiva sintomática con las actividades habituales.
- Aneurisma ventricular o aórtico.
- Valvulopatía grave, estenosis aórtica.

- Miocarditis.
- Hipertensión severa (tensión sistólica superior a 250 mmHg y/o diastólica superior a 120 mmHg) no controlada o inducida por el ejercicio.
- Cor pulmonare.
- Embolismo pulmonar o sistémico reciente.
- Trastornos metabólicos no controlados: hipertiroidismo, diabetes.
- Enfermedad infecciosa aguda.
- Problemas ortopédicos que impiden la práctica de ejercicio.

**Tabla II.2. Contraindicaciones absolutas para la práctica de ejercicio físico.**

**Circunstancias que requieren precauciones especiales para la práctica de ejercicio físico.**

- Angina estable.
- Insuficiencia cardíaca congestiva sintomática con el ejercicio.
- Hipertensión arterial (superior a 180/110 mmHg, pero inferior a 250/115 mmHg).
- Enfermedad vascular periférica (tromboflebitis).
- Cirugía mayor reciente.
- Estenosis aórtica moderada.
- Cardiomegalia importante.
- Diabetes mellitus tratada con insulina.
- Anemia con hemoglobina inferior a 10 g/dl.
- Trastornos psiquiátricos mayores.
- Epilepsia.
- Embarazo complicado.

**Tabla II.3. Circunstancias que requieren precauciones especiales para la práctica de ejercicio físico.**

En la anamnesis se deben recoger los siguientes datos:

- ✓ Antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, pulmonar o metabólica.
- ✓ Antecedentes personales médicos, quirúrgicos y ortopédicos.
- ✓ Alergias
- ✓ Toma actual de medicamentos.
- ✓ Consumo de café, alcohol, tabaco y drogas.
- ✓ Ejercicio realizado hasta la fecha.

La exploración física debe ser completa y rigurosa, con especial atención a los aparatos cardiovascular, respiratorio y locomotor. Debe incluir:

- ✓ Peso y talla.
- ✓ Tensión arterial
- ✓ Auscultación pulmonar.
- ✓ Auscultación cardíaca y de las arterias carótidas.
- ✓ Palpación de pulsos centrales y periféricos.
- ✓ Exploración neurológica.
- ✓ Exploración de grandes articulaciones y columna vertebral.

Como guía puede utilizarse el cuestionario de aptitud para la actividad física (The Physical Activity Readness Questionnaire) (American medical association, 1990)

que constituye el patrón de anamnesis mínima recomendada para comenzar a realizar ejercicio físico de poca o moderada intensidad y sirve para detectar a personas en las que la actividad física podría ser inadecuada.

Tras haber realizado anamnesis y exploración física, en dependencia de los hallazgos realizados, efectuaremos una o varias pruebas complementarias:

- Electrocardiograma de reposo.
- Análítica general (en una persona sana no es necesaria si ya hay una analítica normal en los cinco años previos).

- Prueba de esfuerzo (en personas con dos o más factores de riesgo cardiovascular).

Con los datos obtenidos en la anamnesis (antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, tabaquismo, sedentarismo), en la exploración física (índice de masa corporal, tensión arterial) y en la analítica (cifras de colesterol total de HDL-colesterol y de glucosa en sangre) y aplicando la tabla de Anderson de predicción del riesgo cardiovascular del estudio Framingham clasificamos a los pacientes en riesgo cardiovascular bajo, moderado o alto.

Como resultado de la valoración se debe decidir la idoneidad o no idoneidad de la práctica de ejercicio físico. Las personas asintomáticas y sin hallazgos patológicos en la valoración médica podrán realizar cualquier ejercicio físico o deporte sin necesidad de supervisión o restricciones.

Por tanto, existen numerosas evidencias a favor de la recomendación de la práctica regular de ejercicio físico, pero para reducir al mínimo posible los riesgos debemos previamente realizar una completa valoración del estado de salud y de la aptitud del individuo para el ejercicio.

Esta valoración implica una serie de recomendaciones al paciente sobre la indicación, limitaciones o contraindicación del ejercicio físico según su estado de salud y debe repetirse con una periodicidad anual o máximo bianual para seguir la evolución y adaptar las recomendaciones a la nueva situación del paciente.

## **2. MÉTODO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.**

### **2.1. Características de la prueba de esfuerzo físico.**

La prueba consiste en la XX subida al Pico veleta en una carrera continua que combina carrera de montaña y prueba de ultrafondo. Esta subida al pico Veleta es una de las carreras más duras del mundo. Los casi 2.800 metros de desnivel en una ascensión permanente y unas condiciones climatológicas cambiantes a lo largo de la prueba son un duro reto para los participantes.

Comienza a las 7:00 de la mañana del día 1 de Agosto siendo la salida desde el Paseo del Salón de Granada, a 640 m sobre el nivel del mar. La carrera transcurre desde

el inicio por el asfalto y los participantes dan dos vueltas al Paseo del Salón con dirección a Sierra Nevada.

La ascensión transcurrirá por el tramo antiguo de la carretera de Sierra Nevada, a través de la carretera más alta de Europa, pasando por los municipios de Cenes de la Vega, Pinos Genil, Carretera Sierra Nevada (tramo antiguo), con perfil de falso llano hasta el km. 11 (hasta los 770m de altitud), quedando 39 kms. de continua subida, con pequeños rellanos en ref. de kms. 17 (1300 m de altitud), 20 y 21 (1.450 m de altitud) y 30 (2.100 m de altitud). La distancia total de la prueba es de unos 50 kms de recorrido; subiendo hacia una altitud de 3470 m.

Hay que tener en cuenta las condiciones en las que transcurre la carrera como son la temperatura ambiental dada la fecha en la que se celebra, aunque si bien no es muy elevada al comienzo de la misma, conforme pasan las horas el efecto de la alta temperatura es más acusado en los participantes. En un estudio se ha observado que la hipertermia incrementa el estrés oxidativo inducido por el ejercicio, afectando selectivamente a los marcadores lipídicos, independientemente del consumo de Oxígeno (McAnulty, S.R., et al, 2005). Por lo que pueden ser habituales en la prueba los desmayos, la fatiga, la deshidratación, la falta de oxígeno, las quemaduras solares para los participantes que realizan el ascenso.

Tenemos que considerar que la prueba era de ascenso y conforme ascendemos en altitud la presión del aire es menor, por lo que existe una menor disponibilidad de Oxígeno y puede aparecer dificultades para respirar y antes la fatiga.



**Fotografía II.1. Un grupo de participantes en plena actividad física realizando el ascenso por asfalto en la carretera hacia Sierra Nevada.**

El itinerario por el que transcurre la prueba se muestra en la siguiente ilustración:



Ilustración II.1. En esta ilustración se especifica el itinerario por el que transcurre la prueba de ejercicio físico, detallándose la altitud de los distintos tramos.

Los cambios de pendiente a lo largo de la subida se especifican en las gráficas adjuntas:



La prueba transcurre por asfalto a través de la carretera más alta de Europa, dando dos vueltas al Paseo del Salón, dirección Sierra Nevada pasando por los municipios de Cenes de la Vega, Pinos Genil, Carretera Sierra Nevada (tramo antiguo), con perfil de falso llano hasta el km. 11, quedando 39 kms. de continua subida, con pequeños rellanos en ref. de kms. 17, 20, 21 y 30.

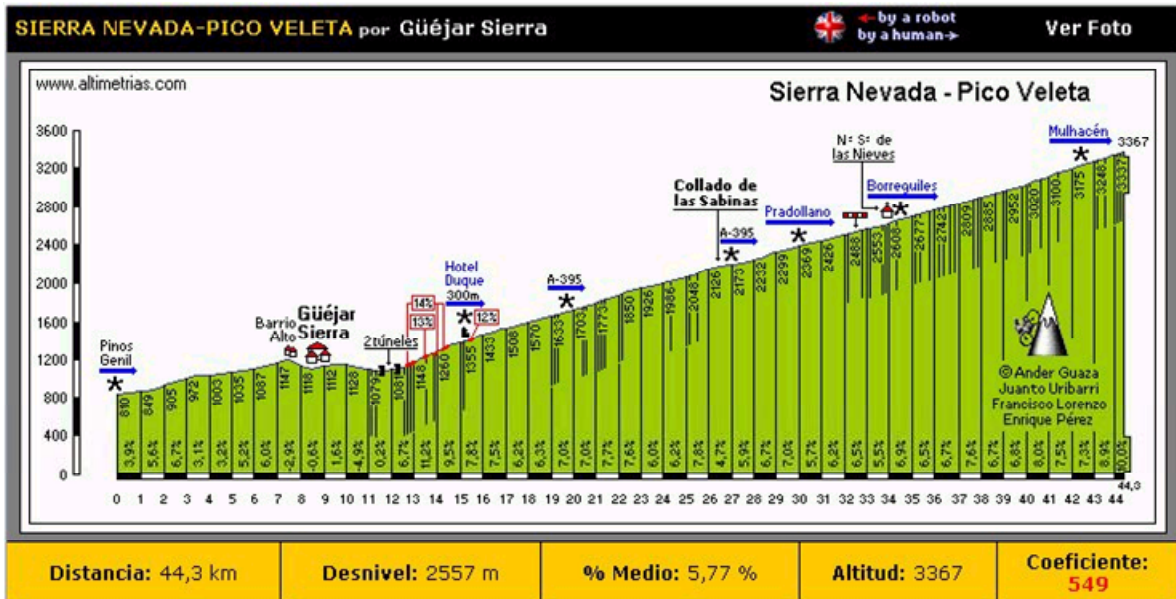


Gráfico II.1. En este gráfico se nos muestran detalladamente los cambios de pendiente que afrontan los participantes conforme realizan el ascenso hasta el pico Veleta.

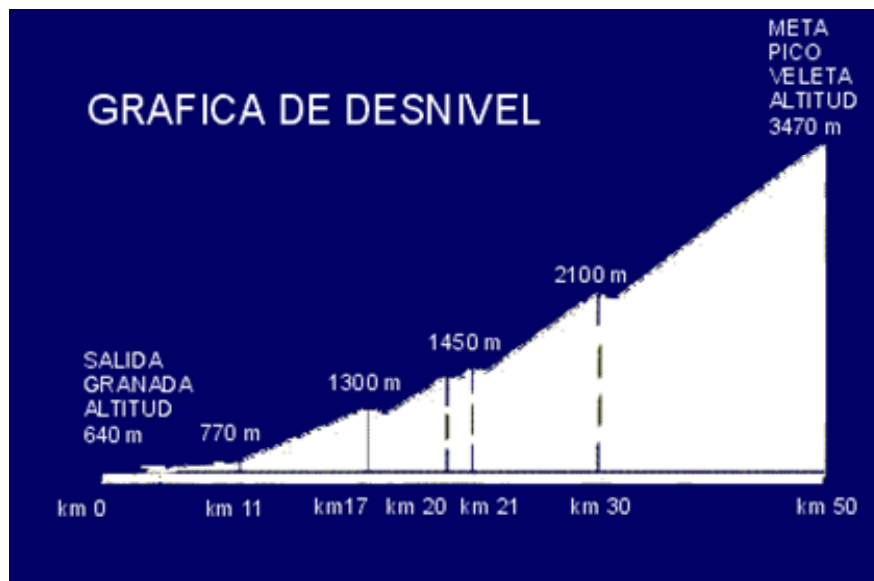


Gráfico II.2. En esta gráfica de desnivel se observan la altitud de los distintos tramos de la carrera en una vista de perfil.

La duración de la prueba fue variable según la capacidad de cada participante siendo el tiempo empleado el que se muestra en las siguientes tablas en los distintos grupos en los que se especifica la edad:

<b><u>GRUPO MELATONINA.</u></b>			
Código del Deportista.	Edad (años)	Fecha de nacimiento	Tiempo (h,m)
1-M	53	1951	5h 14'
2-M	48	1956	5h 51'
3-M	41	1963	5h 32'
4-M	40	1964	5h 20'
5-M	38	1966	6h 46'
6-M	34	1970	6h 24'
7-M	32	1972	5h 12'
8-M	28	1976	5h 51'
<b>Media</b>	<b>39,25</b>		<b>5h 34'</b>
<b>EEM</b>	<b>2,92</b>		<b>0,31</b>

Tabla II. 4. Participantes del grupo melatonina.

<b><u>GRUPO COENZIMA Q10.</u></b>			
Código del deportista	Edad (años)	Fecha de nacimiento	Tiempo (h,m).
1-C	53	1951	5h 37'
2-C	51	1953	5h 28'
3-C	46	1958	6h 24'
4-C	44	1960	6h 46'
5-C	39	1965	5h 03'
6-C	36	1968	5h 06'
7-C	34	1970	5h 49'
8-C	31	1973	7h 02'
<b>Media</b>	<b>41,75</b>		<b>5,74</b>
<b>EEM</b>	<b>2,84</b>		<b>0,26</b>

Tabla II.5. Participantes del grupo Coenzima Q10.

<b><u>GRUPO PHLEBODIUM</u></b>			
Código	Edad(años)	Fecha de nacimiento	Tiempo(h, m).
1-F	37	1967	7h 58'
2-F	47	1957	5h 20'
3-F	40	1964	6h 0'
4-F	39	1965	6h 44'
5-F	38	1966	5h 42'
6-F	34	1970	4h 29'
7-F	32	1972	-----
8-F	51	1953	5h 55'
9-F	20	1984	7h 01'
<b>Media</b>	<b>37,56</b>		<b>5h 94'</b>
<b>EEM</b>	<b>3,14</b>		<b>0,37</b>

Tabla II. 6. Participantes del grupo *Phlebodium decumanum*.

<b><u>GRUPO PLACEBO(ANTES).</u></b>			
Código del deportista	Edad(años)	Fecha de nacimiento	Tiempo(h,m).
1-P	38	1966	4h 39'
2-P-A	----		
3-P-A	----		
4-P	43	1961	5h 41'
5-P	47	1957	5h 23'
6-P-A	41	1963	-----
7-P	33	1971	5h 44'
8-P-A	---		
9-P	53	1951	6h 43'
<b>Media</b>	<b>42,50</b>		<b>5h 38'</b>
<b>EEM</b>	<b>2,85</b>		<b>0,30</b>

Tabla II.7. Participantes del grupo placebo.

<b><u>GRUPO PLACEBO (DESPUÉS).</u></b>			
Código	Edad(años)	Fecha de nacimiento	Tiempo(h,m).
1-P	38	1966	4h 39'
2-P-D	29	1975	4h 29'
3-P-D	42	1962	7h 20'
4-P	43	1961	5h 41'
5-P	47	1957	5h 23'
6-P-D	50	1954	7h 34'
7-P	33	1971	5h 44'
8-P-D	40	1964	6h 30'
9-P	53	1951	6h 43'
<b>Media</b>	<b>41,67</b>		<b>5h 80'</b>
<b>EEM</b>	<b>2,58</b>		<b>0,38</b>

Tabla II.8. Participantes del grupo placebo.

Grupo	Tiempo (media±eem)
Placebo	5h 59'± 0,34
Melatonina	5h 54'± 0,31
Coenzima Q10	5h 74'± 0,26
<i>Phlebodium</i>	5h 94'± 0,37'

Tabla II.9. Comparación del tiempo medio empleado en realizar la carrera en los distintos grupos.

## **2.2. Definición de las variables de estudio.**

El análisis de los efectos del *Phlebodium decumanum* sobre las distintas variables dependientes se ha realizado mediante una experimentación provocada. El diseño de esta investigación consiste en un estudio a simple ciego, multigrupo con cuatro grupos: un grupo placebo (los deportistas no conocían el tratamiento que recibían, pero los autores del estudio sí) y tres grupos experimentales que tomaban

melatonina, coenzima Q10 y *Phlebodium* desconociendo qué suplemento tomaban en cada caso. La validez interna de este diseño viene determinada porque las mediciones se han realizado siempre en los mismos intervalos temporales.

### **2.2.1. Variables independientes.**

#### 2.2.1.1. Aporte nutricional de Melatonina.

El aporte que se le realizó al grupo de Melatonina consistió en la administración vía oral de un total de 5 comprimidos de 3 mg cada uno con la siguiente posología:

- ✓ 1 comprimido el día 30 de Julio con la cena.
- ✓ 3 comprimidos el día 31 de Julio (distribuidos en tres tomas: desayuno-almuerzo -cena).
- ✓ 1 comprimido el mismo día de la carrera (día 1 de Agosto), inmediatamente antes del comienzo de la carrera.

#### 2.2.1.2. Aporte nutricional de coenzima Q<sub>10</sub>.

El aporte fue de una dosis total de 5 comprimidos con administración vía oral. El contenido por comprimido era de 30 mg de Co Q<sub>10</sub>, con igual posología.

#### 2.2.1.3. Aporte nutricional de *Phlebodium decumanum*.

El aporte de *Phlebodium decumanum* cuya acción sobre los parámetros queremos investigar que se le administró a los deportistas fue una dosis en forma de cápsulas de 400 mg cuyo contenido era de 250 mg de extracto de fracción hidrosoluble de fronde y 150 mg de polvo de rizoma por cápsula. La posología fue la misma que en el grupo anterior.

El extracto de *Phlebodium decumanum* se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito en la patente de invención española “Empleo de formulaciones a base de fracciones hidrosolubles de *Phlebodium decumanum* (EXPLY-37) *Polypodium leucotomos* como complemento nutricional en la prevención y reversión del síndrome de sobreesfuerzo físico (González Jurado, JA, 2003).

Las formulaciones se obtienen a partir de una fracción hidrosoluble del fronde, purificada y estandarizada del helecho *Phlebodium decumanum*. Esta fracción se obtiene por extracción hidroalcohólica de los frondes maduros, secos y triturados,

seguida de la eliminación del disolvente orgánico, concentración de la fase acuosa y purificación. La dosis diaria administrada se basa en los estudios realizados Punzón y col. (2001) y De Teresa y col. (2002).

#### 2.2.1.4. Aporte nutricional de placebo.

Los sujetos que pertenecían al grupo placebo tomaban el mismo número de cápsulas y con la misma pauta. El contenido de éstas era a base de levadura de cerveza, que es totalmente inocuo.

Los responsables del laboratorio encargado de elaborar las cápsulas decidieron utilizar como placebo la levadura de cerveza, en primer lugar y más importante, por ser un producto totalmente inocuo, y en segundo lugar por tratarse de una sustancia con unas características externas similares al producto estudiado.

### **2.2.2. Variables dependientes.**

#### 2.2.2.1. Parámetros sanguíneos bioquímicos e inflamatorios.

A) Niveles plasmáticos bioquímicos de:

- Bilirrubina total.
- Colesterol total.
- Fosfolípidos.
- Triglicéridos.
- Proteínas totales.
- Viscosidad plasmática.
- Melatonina.
- Capacidad antioxidativa.

B) Niveles plasmáticos inflamatorios de:

- Interleukina-6.
- Receptor antagonista de la IL-1.
- TNF- $\alpha$
- Receptor soluble II del TNF- $\alpha$ .

#### 2.2.2.2. Parámetros sanguíneos en eritrocitos:

- Proteínas de citosol.



- Hemoglobina en citosol.
- Proteínas de membrana.
- Hidroperóxidos en membrana basales.
- Hidroperóxidos en membrana inducidos con AAPH.

#### 2.2.2.2. Parámetros en orina.

- 8 hidroxiguanosina.
- Creatinina.

#### **2.2.3. Variables control.**

Nuestro interés está en que los deportistas que participan en la prueba de ejercicio físico, que ya son activos de forma regular, no alteren sustancialmente los hábitos diarios y además en que todos estén en las mismas condiciones. Por estos motivos se controló:

- Cambios en la alimentación: cantidad (por exceso o por defecto en la dieta diaria) o por modificación del tipo habitual de alimentos en la dieta.
- Control de las prácticas físico-deportivas: tipo, duración e intensidad aproximada diaria.
- Control del tiempo de descanso (de sueño y de no actividad física).
- Padecer alguna enfermedad o lesión que impida la participación en la prueba de ejercicio físico.
- Tratamiento farmacológico a consecuencia de alguna patología.
- Cumplimiento de la toma del suplemento de cada sujeto.
- Condiciones al inicio y al final de la prueba de ejercicio físico iguales para todos los sujetos (lugar, hora de comienzo del ejercicio físico, temperatura, itinerario, no ingesta dietética entre 3-4 horas antes a la prueba...).

#### **2.3. Instrumental y métodos de medida.**

Se han tomado muestras de sangre venosa periférica antes y después de la prueba a cada uno de los participantes y también muestras de orina. Para la obtención de las muestras sanguíneas se hizo una venoclisis en la flexura del codo del brazo empleando los tubos correspondientes.

● **Descripción del proceso de extracción de las muestras de sangre venosa periférica.**

Los deportistas son identificados convenientemente antes de la extracción y perfectamente etiquetados los botes. Posteriormente, se procede a la toma de la muestra. El sujeto está sentado cómodamente con un brazo extendido. Se aplica el compresor por encima de la articulación del codo, se identifica y localiza una vena periférica de la flexura del codo. Se realiza la punción de la vena y la extracción de la sangre. Todas las extracciones de sangre venosa han sido realizadas por Diplomados en Enfermería. Una vez extraída la muestra comprobar que la cantidad es suficiente y que no existen signos evidentes de hemolización.

Los tubos serán depositados en una gradilla con hielo picado, y transportados sin perder la cadena de frío al laboratorio. Aquí las muestras fueron procesadas de tal manera que se consiga en ese mismo momento aislar membranas de eritrocitos, citosol y plasma, para la medida y determinación de los valores de los parámetros o marcadores bioquímicos e inmunológicos.

● **El material necesario** para la realización del experimento es el que a continuación se expone:

-Hojas de consentimiento informado.

-Hojas para entrevista (anamnesis).

-Báscula, cinta métrica y lipómetro.

-Cronómetros manuales CASIO HS-30W.

-Material para extracción, transporte, almacenamiento y análisis de sangre:

- ✓ Alcohol de 96°.
- ✓ Guantes de látex.
- ✓ Esparadrapo.
- ✓ Compresor de goma.
- ✓ Algodón.
- ✓ Agujas intravenosas estériles de 0,8 x 25 mm (Microlance 3).
- ✓ Jeringas estériles de 20 ml.

- ✓ Tubos al vacío.
- ✓ Tubos de recogida de sangre de bioquímica.
- ✓ Tubos de recogida de sangre con EDTA para citoquinas.
- ✓ Recipientes para muestras de orina.
- ✓ Catéter de punción venosa para tubos con vacío.
- ✓ Heparina sódica intravenosa al 1 %.
- ✓ Suero fisiológico.
- ✓ Gradillas.
- ✓ Nevera con hielo.
- ✓ Congelador programado a la temperatura mínima adecuada.
- ✓ Centrífuga.
- ✓ Material específico de laboratorio.

-Métodos de análisis:

De la sangre se ha aislado el plasma mediante el proceso de centrifugación a 3000 r.p.m durante 15' (3 eppendorf de 1.5ml), membranas de eritrocito (2 eppendorf pequeños y dos grandes) y citosol (3 eppendorf pequeños). Las muestras se conservan a 4°C.

#### **2.4. Método estadístico.**

La Estadística es el conjunto de métodos científicos necesarios para recoger, organizar clasificar, analizar, representar y resumir datos, así como para hacer inferencias (extraer consecuencias y conclusiones) científicas a partir de ellos, como para la toma de decisiones razonadas según dicho análisis. De ahí que conste de dos partes:

A) La **Estadística descriptiva**, cuyo único fin es la recogida, clasificación, representación, resumen y análisis simple de datos sin el establecimiento de conclusiones. Es el paso previo básico para el desarrollo posterior de inferencias acerca de los valores de las variables objeto de estudio, y a la posible extrapolación al sector

*Tesis Doctoral* \_\_\_\_\_ *MATERIAL Y MÉTODOS*  
poblacional correspondiente. Se ha realizado un tratamiento estadístico básico en cada uno de los grupos y parámetros, por lo que los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media para cada grupos y parámetro estudiado. Todo el tratamiento estadístico se ha realizado con el paquete informático SPSS/PC para Windows, versión 12.0 en español.

Por ello, posteriormente se expondrán los resultados del análisis estadístico descriptivo realizado, mediante gráficos y tablas, que explicitan los siguientes elementos estadísticos:

*Medidas de tendencia central:*

Un promedio, o medida de posición es un valor que, en un conjunto de datos, puede ser considerado como representativo de los mismos, por cuanto que está definido por el conjunto de datos a estudiar, describiendo cómo se encuentra el resto de la muestra respecto a dicho número. Los promedios, al tender habitualmente a reflejar el “centro” de los datos ordenados según su magnitud, reciben el nombre de medidas de centralización, al intentar representar toda la muestra. Para el estudio de los datos recogidos en la presente experiencia, se consideró necesario reflejar la media aritmética muestral de las distintas variables, que es la medida de centralización de tamaño más usualmente empleada. La media aritmética de un conjunto de números:  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , que se presentan con frecuencias absolutas  $f_1, f_2, \dots, f_n$  respectivamente es:

$$\bar{X} = \frac{\sum f_i x_i}{\sum f_i} = \frac{\sum f_i x_i}{N}$$

Otra medida de uso común es la mediana, definida como aquel valor, perteneciente o no a la muestra, que deja tantas observaciones de la misma por debajo como por encima; sin embargo, en el presente estudio existe una gran variabilidad de valores, que son reflejados con mayor precisión por la media aritmética, puesto que la mediana se suele emplear cuando no se desea tomar en cuenta los valores extremos.

*Medidas de dispersión:*

La variación o dispersión de datos describe la medida en que los datos numéricos tienden a extenderse en torno a un valor medio representativo de los mismos. En otras palabras, definen cómo de agrupados o dispersos se encuentran los datos de una muestra. Para el presente estudio se emplearon:

- a) Rango, recorrido o amplitud. Es la diferencia entre el valor máximo y mínimo de una distribución.
- b) Varianza: es la media de los cuadrados de las desviaciones a la media. Fácil de calcular, su principal inconveniente es que se expresa en unidades que son el cuadrado de las unidades de referencia originiles.
- c) Desviación típica o desviación estándar (D.S.) Raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de las distancias de cada dato con respecto a la media. Se trata de la medida de dispersión más utilizada en la literatura científica en general, resuelve el problema anteriormente reseñado de la varianza.

*Medidas de forma:*

Asimetría y curtosis. Se trata de dos estadígrafos que ayudan a definir las características de la curva de distribución de una variable. La asimetría hace referencia a un desplazamiento de la curva de distribución en sentido positivo o negativo, en tanto que la curtosis mide el grado de apuntamiento de una función de densidad, determinando la desviación de la normalidad de una variable aleatoria dada. Así, el coeficiente de curtosis es nulo para una distribución normal. Si dicho coeficiente es negativo nos encontramos ante una distribución menos “apuntada” que la normal y recibe el nombre de platicúrtica; si es positivo, la distribución se encuentra más apuntada que la normal, denominándose mesocúrtica; a la distribuciones con coeficientes de curtosis nulo (v.g. las distribuciones normales) se las denomina mesocúrticas.

B) La Inferencia estadística, que tiene por fin extender las conclusiones obtenidas en una parte de la población (muestra) a toda ella.

#### **2.4.1. Estudio descriptivo de los datos.**

Una vez obtenida la muestra se dividió en cuatro grupos de individuos, aplicándole a tres grupos un aporte antioxidante distinto y un cuarto grupo quedó como grupo placebo. Se tomaron muestras sanguíneas y de orina, antes y después de realizar el ejercicio físico intenso de subida a Sierra Nevada para determinar los valores de las correspondientes parámetros y proceder a su posterior comparación.

Una vez obtenidos los resultados o datos numéricos de laboratorio se realizaron los cálculos de los estadísticos descriptivos para cada una de las variables condicionada a cada uno de los grupos al inicio y al final del ejercicio físico. Los estadísticos descriptivos calculados se corresponden:

- para cada una de las variables a todos los resultados de la muestra antes de iniciar la carrera sin diferenciar grupos y a todos los resultados de la muestra después de finalizar la carrera sin diferenciar grupos. (Cod\_1).

- para cada una de las variables a los resultados obtenidos en cada grupo antes y después del ejercicio. (Cod\_2).

Los datos de los resultados eran cuantitativos ya que se expresan numéricamente, y discretos debido a que toman valores numéricos aislados por lo que los estadísticos descriptivos calculados han sido la media, error típico, intervalo de confianza para la media al 95% (con el límite superior e inferior), la media recortada al 5 %, mediana, varianza, desviación típica, mínimo, máximo, rango, amplitud intercuartil, asimetría y curtosis.

#### **2.4.2. Estudio comparativo de los datos. (Inferencia estadística).**

Se comprobará si existen diferencias significativas para cada variable en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo. Para ello, aplicamos la prueba de Levene para la igualdad de varianzas y la prueba T de Student para la igualdad de medias.

Comprobamos también la existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales y el grupo placebo para todas las variables, al inicio y al finalizar la prueba de ejercicio físico. Con tal finalidad realizamos la prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas y la prueba ANOVA, en la que se asume igualdad de varianzas, siendo una prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio o final del ejercicio. En esta prueba además de indicarnos la cantidad de variabilidad nos proporcionó el estadístico de contraste  $F_{exp}$  y el nivel de significación, para aceptar o rechazar la hipótesis de la existencia de diferencias significativas entre los grupos. Fijado nivel de significación del 5 % ( $\alpha=0,05$ ), se rechazó la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los grupos siempre que  $p\text{-valor} < \alpha$ .

Si no se asume la igualdad de varianzas entre los grupos se aplica la prueba Welch y Brown-Forsythe para analizar las diferencias entre los grupos para cada variable al inicio o al final del ejercicio.

Cuando se apreciaron diferencias significativas entre los grupos en un mismo periodo de tiempo se procedió a estudiar mediante comparaciones múltiples a qué son debidas tales diferencias y en qué grupos se constatan. Se han realizado para cada variable las pruebas post hoc siguientes: HSD de Tukey, Scheffé, DMS, Bonferroni, Sidak, Gabriel, Hochberg, Tamhane, T3 de Dunnett, Games-Howell, C de Dunnett, y t de Dunnett (bilateral). Se han obtenido resultados similares en las distintas pruebas por lo que a la hora de exponer nuestros resultados elegimos la prueba DMS y la t de Dunnett.

### **2.5. Método bibliográfico.**

Para la revisión bibliográfica de este estudio se utilizaron las siguientes bases de datos: Medline, Science direct, sport discos, tesoro a través de ERL 'Web SPIRS\*5 y otras fuentes bibliográficas impresas. Por tanto, para la elaboración del presente estudio ha sido precisa la revisión de numerosas publicaciones científicas previas, consideradas de interés, bien científico, bien didáctico, bien metodológico. Han sido consignadas siguiendo en todo momento las normas y sistematización acordadas en la Reunión Internacional de Editores celebrada en Vancouver, junto con los requisitos de uniformidad que se exigen habitualmente para las publicaciones en revistas científicas en general y biomédicas en particular.

## **2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.**

A partir de las muestras sanguíneas extraídas se procede a su análisis en el laboratorio para la obtención de plasma, de citosol y de membranas eritrocitarias con la finalidad de realizar las determinaciones de los parámetros plasmáticos y eritrocitarios de los que describo a continuación el principio y el procedimiento a seguir para cada parámetro para la obtención de los resultados. De igual forma, se analizan las muestras de orina tomadas y se describe el procedimiento para la determinación de los correspondientes parámetros.

### **3.1. OBTENCIÓN DE PLASMA, CITOSOL Y MEMBRANAS DE ERITROCITO PARA ANÁLISIS.**

Las distintas muestras de sangre que se obtenían, se depositaban en tubos heparinizados, que se mantenían a 4° C durante todo el proceso. Se centrifugaban a 2500 r.p.m durante 10-15 min (4-8°C) y seguidamente se separaba el plasma que se congelaba a -80°C hasta el momento de la analítica.

Para la obtención de citosol y membranas eritrocitarias se ha seguido el método descrito por Hanahan y Ekholm (*Hanahan y Ekholm, 1974*) ligeramente modificado. Una vez separado el plasma por centrifugación, se procedió a la eliminación de los leucocitos de la muestra por medio de un lavado con tampón isotónico Tris 310 imOSM de pH 7.6 y posterior centrifugación a 100xg durante 15 minutos a 4° C, eliminándose el sobrenadante y la capa superficial de células por medio de una pipeta pasteur. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces más. Posteriormente, a esta suspensión se le adicionó tampón Tris hipotónico 20 imOSM de pH 7.6 en una proporción 1:5. Tras la centrifugación a 2000xg durante 20 minutos y a 20° C, se obtiene el citosol en el sobrenadante y se continúa con el lavado del precipitado que son las membranas.

La operación de lavado con tampón hipotónico se repitió tres veces. Tras el último lavado, las membranas quedaron con una ligera tonalidad rosácea y el sobrenadante procedente de la hemólisis de los eritrocitos totalmente incoloro. Al finalizar el segundo lavado, se procedió al transvase de las membranas a otro tubo con objeto de dejar atrás el coágulo de pseudofibrina que comunicaba a las membranas una coloración rojiza. La visualización de las membranas se facilitó mediante iluminación lateral del tubo que las contenía.

Tras la eliminación del sobrenadante del último lavado, las membranas se resuspendieron en 1ml de tampón hipotónico, siendo congeladas a -80°C hasta el momento de ser analizadas.

### **3.2. DETERMINACIONES PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.**



### 3.2.1. Bilirrubina total

Para la determinación de bilirrubina total en plasma se ha utilizado un kit comercial (Spinreact, Barcelona, España) (Ref. 1001041).

- Principio del método.

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con cafeína para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada.

- Significado clínico.

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina. Es transportada del bazo al hígado y se excreta en la bilis. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia:

-Bilirrubina total: Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas.

-Bilirrubina directa: colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta los datos clínicos y de laboratorio.

- Procedimiento.

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda:.....540 nm

Cubeta:.....1 cm paso de luz

Temperatura..... 15-25 ° C.

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

3. Pipetear en una cubeta:

	B.Total	Blanco
R 1( $\mu$ L)	200	200
R 2 (gotas)	1	----
ClNa 9 g/L (mL)	---	2,0
R 3(mL)	2,0	--
Muestra/Calibrador( $\mu$ L)	200	200

4. Mezclar e incubar exactamente 5 minutos a 15-25 ° C.

5. Leer la absorbancia (A).

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Conneticut, USA).

### 3.2.2. Proteínas totales plasmáticas.

Para la determinación de proteínas totales en plasma se ha utilizado un kit comercial (Spinreact, Barcelona, España) (Ref. 1001291).

- Principio del método.

En medio alcalino las proteínas dan un intenso color violeta azulado en presencia de sales de cobre. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteína total en la muestra ensayada

- Significado clínico.

Su determinación es útil en la detección de hiperproteinemia y hipoproteinemia.

- Procedimiento.

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda:.....540 nm

Cubeta:.....1 cm paso de luz

Temperatura..... 15-25 ° C.

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ( $\mu$ L)	--	25	--
Muestra ( $\mu$ L)	--	--	25

4. Mezclar e incubar exactamente 5 minutos a 15-25 °C.

5. Leer la absorbancia (A).

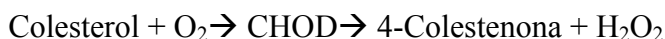
La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Conneticut, USA).

### 3.2.3. Colesterol total.

Para la determinación de colesterol total en plasma se ha utilizado un kit comercial (Spinreact, Barcelona, España) (Ref. 1001090).

- Principio del método.

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

- Significado clínico.

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del colesterol es uno de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 Tampón	PIPES pH 6,9	90 mmol/L
	Fenol	26 mmol/L
R 2 Enzimas	Colesterol esterasa (CHE)	300 U/L
	Colesterol oxidasa (CHOD)	300 U/L
	Peroxidasa (POD)	1250 U/L
	4-aminofenazona (4-AF)	0,4 mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Patrón primario acuoso de colesterol 200 mg/dL	

• Procedimiento.

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda:.....505nm (500-550)

Cubeta:.....1 cm paso de luz

Temperatura.....37°C / 15-25 °C.

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	---	10

4. Mezclar e incubar 5 minutos a 37 ° C o 10 minutos a temperatura ambiente.

5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

- Cálculos.

(A) Muestra

\_\_\_\_\_ x 200 (Conc.Patrón) =mg /dL de colesterol en la muestra

(A) Patrón

Factor de conversión: mg /dL x 0,0258 = mmol/L.

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Conneticut, USA).

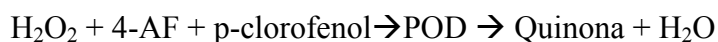
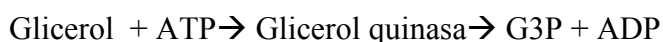
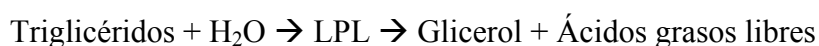
### 3.1.4. Triglicéridos.

Para la determinación de triglicéridos plasmáticos se ha utilizado un kit comercial (Spinreact, Barcelona, España) (Ref. 1001310).

- Principio del método.

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenada (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) reacciona con 4- aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada.

- Significado clínico.

Los triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre. Una dieta alta en grasas saturadas o carbohidratos puede elevar los niveles de triglicéridos. Su aumento es relativamente inespecífico. Diversas dolencias, como ciertas disfunciones hepáticas (cirrosis, hepatitis, obstrucción biliar) o diabetes mellitas, pueden estar asociadas con su elevación.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en todos los datos clínicos y de laboratorio.

## REACTIVOS

R 1 Tampón	GOOD pH 7,5 50mmol/L p-clorofenol 2mmol/L
R 2 Enzimas	Lipoprotein lipasa(LPL) 150000 U/L Glicerol quinasa(GK) 500 U/L Glicerol-3-oxidasa (GPO) 2500U/L Peroxidasa (POD) 440 U/L 4-aminofenazona(4-AF) 0,1mmol/L ATP 0,1mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL	Patrón primario acuoso de Triglicéridos 200 mg/dL

- Procedimiento.

## 1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda:.....505nm (490-550)

Cubeta:.....1 cm paso de luz

Temperatura.....37°C / 15-25 ° C.

## 2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

## 3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	---	10

## 4. Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C o 10 minutos a temperatura ambiente.

5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

- Cálculos.

(A)Muestra

\_\_\_\_\_ x 200 (Conc. Patrón)=mg/dl de triglicéridos en la muestra.

(A) Patrón

Factor de conversión: mg/dl x 0,0113 = mmol/l.

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Connecticut, USA).

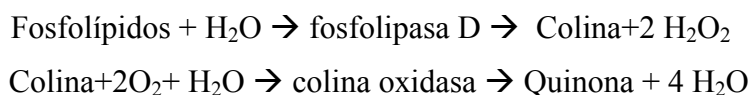
### 3.2.5. Fosfolípidos.

Para la determinación de fosfolípidos plasmáticos se ha utilizado un kit comercial (Spinreact, Barcelona, España) (Ref. 1001140).

- Principio del método.

Es un método CHO-POD enzimático colorimétrico.

Los fosfolípidos son hidrolizados por la fosfolipasa D y la colina liberada es secuencialmente oxidada por la colina oxidasa (CHO) a betaína, con la simultánea producción de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) el peróxido de hidrógeno acopla oxidativamente a la 4-Aminofenazona (4-AF) y al dicloro fenol formando una quinonamina coloreada:



La intensidad del color formada es proporcional a la concentración de fosfolípidos presentes en la muestra ensayada.

- Significado clínico.

Los fosfolípidos son moléculas lipídicas que contienen fosfatos. Su función como componente principal de las membranas celulares hace de los fosfolípidos un elemento esencial para las células.

La determinación de fosfolípidos en suero es un indicador clínico importante para el diagnóstico de alteraciones del hígado, fundamentalmente ictericias obstructivas.

- Procedimiento.

## 1. Condiciones de ensayo:

Longitud de onda:.....505 nm (490-550).

Cubeta:.....1 cm paso de luz.

Temperatura.....37° C.

## 2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

## 3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (ml)	1,0	1,0	1,0
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra(µL)	--	--	10

## 4. Mezclar e incubar 5 minutos a 37 ° C.

5. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

## 6. Cálculos.

$$(A) \text{Muestra} \times 300 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dl de fosfolípidos en la muestra.}$$

(B) Patrón

Factor de conversión: mg/dl x 0,0129= mmol/l.

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Conneticut, USA).

### 3.3. DETERMINACIONES PARÁMETROS INFLAMATORIOS.

#### 3.3.1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TNF- $\alpha$ EN PLASMA.

Los niveles de TNF- $\alpha$  plasmático fueron determinados mediante un kit comercial de Biosource Europa (Nivelles, Bélgica) (TNF- $\alpha$  EASIA, nº catálogo KAC1752). Se trata de un enzima inmunoensayo (ELISA) basado en un sistema oligoclonal, en el cual una mezcla de anticuerpos monoclonales son usados directamente contra distintos epítomos del TNF- $\alpha$ , lo cual aumenta la especificidad y la sensibilidad del ensayo.

- Principio del método.

El TNF- $\alpha$  de las muestras reacciona con anticuerpos monoclonales



anclados en la microplaca, a continuación se adiciona un anticuerpo conjugado con una horseradish peroxidasa, creándose un sándwich: anticuerpo anclado- TNF- $\alpha$ - anticuerpo conjugado. Posteriormente se adiciona una solución cromogénica (TMB (tetrametilbenzidina)+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que reacciona con los anticuerpos etiquetados con la enzima, esta reacción es finalmente parada con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La proporción de TNF- $\alpha$  es finalmente medida en un lector de microplacas (Sinergy HT, Bio-tek (Vermont, USA) a 450 nm. Los niveles son calculados mediante la realización de una curva patrón con un estándar de TNF- $\alpha$ .

● **Resumen del ensayo:**

	<b>Estándares y Controles</b>	<b>Plasma</b>
<b>Buffer incubación</b>	50	50
<b>Estándares (0-5)</b>	200	-
<b>Control-Plasma</b>	-	200
<b>Incubar 2 horas a T<sup>a</sup> con agitación; Aspirar el contenido de cada pocillo; Lavar 3 veces</b>		
<b>Estándar 0</b>	100	100
<b>Anti-TNF-<math>\alpha</math>-HRP</b>	50	50
<b>Incubar 2 horas a T<sup>a</sup> con agitación; Aspirar el contenido de cada pocillo; Lavar 3 veces</b>		
<b>Cromógeno</b>	200	200
<b>Incubar 30 minutos con agitación y oscuridad</b>		
<b>Solución parante</b>	50	50
<b>Leer a 450 nm (versus 630 o 650) y a 490 (versus 630 y 650)</b>		

### 3.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INTERLEUKINA-6 (IL-6) EN PLASMA.

Los niveles de IL-6 plasmáticos fueron determinados mediante un kit comercial de Biosource Europa (Nivelles, Bélgica) (IL-6 EASIA, n° catálogo KAC1262). Se trata de un enzima inmunoensayo (ELISA) basado en un sistema oligoclonal, en el cual una mezcla de anticuerpos monoclonales son usados directamente contra distintos epitopos

de la IL-6, lo cual aumenta la especificidad y la sensibilidad del ensayo.

● **Principio del método.**

La IL-6 de las muestras reacciona con anticuerpos monoclonales anclados en la microplaca, a continuación se adiciona un anticuerpo conjugado con una horseradish peroxidasa, creándose un sandwich: anticuerpo anclado- IL-6- anticuerpo conjugado. Posteriormente, se adiciona una solución cromogénica (TMB (tetrametilbenzidina)+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que reacciona con los anticuerpos etiquetados con la enzima, esta reacción es finalmente parada con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La proporción de IL-6 es finalmente medida en un lector de microplacas (Sinergy HT, Bio-tek (Vermont, USA) a 450 nm. Los niveles son calculados mediante la realización de una curva patrón con un estándar de IL-6.

● **Resumen del ensayo:**

	<b>Estándares y Controles</b>	<b>Plasma</b>
<b>Solución B</b>	50	50
<b>Solución A</b>	-	-
<b>Estándares (0-5), control</b>	100	-
<b>Plasma</b>	-	100
<b>Incubar</b> 1 hora a T <sup>a</sup> con agitación; <b>Aspirar</b> el contenido de cada pocillo; <b>Lavar</b> 3 veces		
<b>Anti-IL 6-HRP</b>	100	100
<b>Solución A</b>	50	50
<b>Incubar</b> 1 hora a T <sup>a</sup> con agitación; <b>Aspirar</b> el contenido de cada pocillo; <b>Lavar</b> 3 veces		
<b>Cromógeno</b>	200	200
<b>Incubar</b> 15 minutos con agitación y oscuridad		
<b>Solución parante</b>	100	100
<b>Leer</b> a 450 nm (versus 630 o 650)		

### 3.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR SOLUBLE TIPO-II DEL TNF- $\alpha$ (sTNF-RII) EN PLASMA.

Los niveles de sTNF-RII plasmáticos fueron determinados mediante un kit comercial de Biosource Europa (Nivelles, Bélgica) (sTNF-RII EASIA, n° catálogo KAC1772). Se trata de un enzima inmunoensayo (ELISA) basado en un sistema oligoclonal, en el cual una mezcla de anticuerpos monoclonales son usados directamente contra distintos epitopos de sTNF-RII, lo cual aumenta la especificidad y la sensibilidad del ensayo.

- **Principio del método.**

El sTNF-RII de las muestras reacciona con anticuerpos monoclonales anclados en la microplaca, a continuación se adiciona un anticuerpo conjugado con una horseradish peroxidasa, creándose un sándwich: anticuerpo anclado- sTNF-RII - anticuerpo conjugado. Posteriormente se adiciona una solución cromogénica (TMB (tetrametilbenzidina)+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que reacciona con los anticuerpos etiquetados con la enzima, esta reacción es finalmente parada con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La proporción de sTNF-RII es finalmente medida en un lector de microplacas (Sinergy HT, Bio-tek (Vermont, USA) a 450 nm. Los niveles son calculados mediante la realización de una curva patrón con un estándar de sTNF-RII.

- **Resumen del ensayo:**

	<b>Estándares</b>	<b>Plasma y control</b>
<b>Estándares (0-5)</b>	50	-
<b>Plasma, control</b>	-	50
<b>Anti-sTNF-RII_HRP</b>	200	200
<b>Incubar</b> 1 hora a T <sup>a</sup> con agitación; <b>Aspirar</b> el contenido de cada pocillo; <b>Lavar</b> 3 veces		
<b>Cromógeno</b>	50	50
<b>Incubar</b> 15 minutos con agitación y oscuridad		
<b>Solución parante</b>	200	200
<b>Leer</b> a 450 nm (versus 630 o 650)		

### 3.3.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR ANTAGONISTA DE LA INTERLEUKINA-1 (IL-1RA) EN PLASMA.

Los niveles de IL-1ra plasmáticos fueron determinados mediante un kit comercial de Biosource Europa (Nivelles, Bélgica), (IL-1ra Cytoscreen, nº catálogo 1182). Se trata de un ensayo en fase sólida realizado sobre microplacas. El IL-1ra contenido en las muestras reacciona con anticuerpos monoclonales y anticuerpos monoclonales biotinilados anclados en la microplaca.

- **Principio del método.**

El IL-1ra de las muestras reacciona con los dos tipos de anticuerpos monoclonales creándose un sándwich: anticuerpo - IL-1ra - anticuerpo conjugado. A continuación se adiciona una enzima estreptavidina-peroxidasa que reacciona con el anticuerpo conjugado. Posteriormente se adiciona una solución parante y se lee a 450 nm en un lector de microplacas (Sinergy HT, Bio-tek (Vermont, USA) a 450 nm. Los niveles son calculados mediante la realización de una curva patrón con un estándar de IL-1ra.

- **Resumen del ensayo:**

	<b>Estándares y Controles</b>	<b>Plasma</b>
<b>Buffer incubación</b>	100	100
<b>Estándares (0-7), control</b>	100	-
<b>Plasma</b>	-	100
<b>Anti-IL-1ra Biotina-conjugado</b>	50	50
<b>Incubar 2 horas a T<sup>a</sup>; Aspirar el contenido de cada pocillo; Lavar 3 veces</b>		
<b>Estreptavidina-HRP</b>	100	100
<b>Incubar 1 hora a T<sup>a</sup>; Aspirar el contenido de cada pocillo; Lavar 3 veces</b>		
<b>Solución cromogénica</b>	100	100
<b>Incubar 30 minutos en oscuridad</b>		
<b>Solución parante</b>	100	100
<b>Leer a 450 nm (versus 630 o 650) y a 490 (versus 630 y 650)</b>		

### 3.4. OTRAS DETERMINACIONES EN PLASMA.

#### 3.4.1. Viscosidad plasmática

La viscosidad plasmática es un factor importante que influye en la viscosidad sanguínea, correlacionándose directamente con la concentración de grandes moléculas en el plasma, en especial proteínas.

Aunque se han definido muchos métodos para su medida, con el fin de utilizar criterios estandarizados para hacer posible una comparación de nuestros resultados con los de otros autores, hemos seguido las normas del Comité Internacional para la Estandarización en Hemorreología (*Internacional Comité for standarization in haematology, 1984*).

Determinamos la viscosidad plasmática en muestras de plasma obtenidas a partir de 1 ml de sangre anticoagulada con heparina litio, por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. En cualquier caso, las medidas se realizan antes de las seis horas después de obtener las muestras, separando previamente el plasma y el paquete globular.

Las modificaciones de la viscosidad plasmática dependen del tiempo y frecuencia con que las células en suspensión están en contacto con el plasma (lisis celular). Por este motivo, en nuestra experiencia el tiempo transcurrido entre la extracción sanguínea y la centrifugación de la muestra no fue en ningún caso superior a seis horas. La sangre recogida y centrifugada inmediatamente, mantiene una viscosidad plasmática estable durante un periodo de 24 horas a temperatura ambiente.

Para medir la viscosidad de líquidos, deben ser definidos los parámetros que son efectivos en el proceso de flujo. Después tienen que ser halladas las condiciones de ensayo adecuadas que permitan una medición del comportamiento de fluidez de manera objetiva y reproducible.

Utilizamos un viscosímetro de caída de bola (Haake). Una muestra líquida, se encuentra en un tubo de vidrio por el que se deslizará la bola, el cual puede ser exactamente atemperado con un termostato de circulación a través de su camisa de atemperación. Este tubo está inclinado 10° respecto a la vertical y posee dos marcas

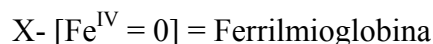
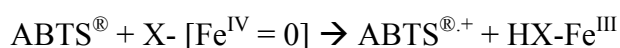
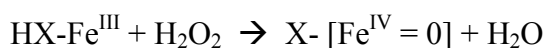
anulares A y B en una distancia  $\Delta L = 100$  mm. Una bola cae a través del líquido a medir. Desde la posición inicial de la bola hasta la primera marca anular A se necesita el tramo  $L_v$  para alcanzar una velocidad de caída constante de la bola, o sea, para alcanzar condiciones de flujo estacionarias. Se mide el tiempo  $\Delta t$  que precisa la bola para atravesar el tramo entre las marcas A y B. Este valor  $\Delta t$  se utiliza para calcular la viscosidad absoluta en las unidades usuales (mPa.s). El instrumento se calibra por medio de un líquido newtoniano de viscosidad conocida.

### 3.4.2. Capacidad antioxidativa total.

La capacidad antioxidativa total en plasma fue determinada mediante un kit comercial de Randox (Antrim, Reino Unido) (Total Antioxidant Status, n° catálogo NX 2332).

- **Principio del método.**

ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) se incubaba con una peroxidasa (metmioglobina) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para producir un cation radical de ABTS<sup>®</sup>, relativamente estable y de color azul-verdoso, el cual se mide a 600 nm. Los antioxidantes presentes en la muestra causan supresión del color de manera proporcional a su concentración.



- **Procedimiento.**

1. Lectura a 600 nm, 1cm de paso de luz (cubeta), 37°C y medidas contra el aire.
2. Pipetear en una cubeta los siguientes:

	Blanco	Estándar	Muestra
Agua bidestilada	20 µl	-	-
Estándar	-	20 µl	-
Muestra	-	-	20 µl
Cromógeno (Metmioglobina y ABTS)	1 ml	1 ml	1 ml

3. Mezclar e incubar a 37° C y leer la absorbancia inicial ( $A_1$ ).

4. Adicionar 200 µl de sustrato ( $H_2O_2$ ) (al blanco, estándar y muestra), agitar y comenzar a contabilizar el tiempo, leer transcurridos exactamente 3 minutos ( $A_2$ ) a 37°C.

$A_2 - A_1 = \Delta A$  de la muestra/estándar/blanco.

**-Cálculo:**

Factor = concentración estándar / ( $\Delta A$  blanco -  $\Delta A$  estándar)

mmol/l = Factor X ( $\Delta A$  blanco -  $\Delta A$  muestra)

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Conneticut, USA).

### 3.4.3. Melatonina.

Su determinación en plasma ha sido realizada mediante la utilización de un kit comercial de la casa Labor Diagnostica Nord (LDN) (Nordhom, Alemania). Este kit proporciona el material necesario para la medida cuantitativa de melatonina en plasma mediante radioinmunoensayo  $I^{125}$ . El proceso sigue los principios básicos de radioinmunoensayo, incluyendo la competencia entre un antígeno radioactivo y otro no radioactivo para los sitios de unión de los anticuerpos. La cantidad de antígenos marcados con yodo-125 unidos al anticuerpo, es inversamente proporcional a la concentración de la muestra analizada. Cuando el sistema está equilibrado, el anticuerpo marcado radiactivamente precipita con un segundo anticuerpo en presencia de polietilenglicol. El precipitado se contabiliza en un contador *gamma* y la cuantificación de muestras desconocidas, se realiza comparando su actividad con una curva de referencia preparada con estándares conocidos.

- Procedimiento.

En primer lugar, se reconstituyeron los estándares, controles y enzimas siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

A continuación, se pipetearon 100  $\mu\text{L}$  de muestra, estándares y controles en sus correspondientes tubos etiquetados, a los cuales se les adicionó 25  $\mu\text{L}$  de la solución enzimática. Los tubos fueron agitados, centrifugados a 500 g durante un minuto e incubados 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se le adicionó 50  $\mu\text{L}$  de buffer de ensayo y 50  $\mu\text{L}$  de melatonina marcada con yodo 125; tras su mezcla, se centrifugó a 500 g durante 1 minuto y se incubaron de 15 a 20 horas a temperatura ambiente; tras dicha incubación, se le adicionó 500  $\mu\text{L}$  de mezcla precipitante fría, mezclándose fuertemente e incubándose 15 minutos a 2-8° C.

Finalmente, los tubos fueron centrifugados 15 minutos a 3000 g, se eliminó el sobrenadante y fueron dejados en un contador gamma durante 1 minuto.

A los valores obtenidos es necesario sustraer el valor de referencia o blanco. Para la cuantificación de la melatonina se creó una regresión sigmoidea a partir de estándares de concentraciones conocidas, similar a la mostrada en la figura II.1.

### Regresión sigmoidea

$$Y = a + b / (1 + \exp(-(x-b)/c))$$

$$R^2 = 0,9962$$

$$a = 0,000$$

$$b = 97,7062$$

$$c = 4,6151$$

$$d = -0,7084$$

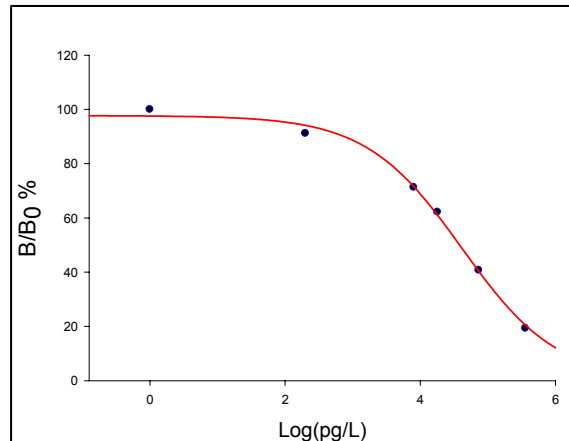


Figura II.1. Regresión sigmoidea para la cuantificación de melatonina.

## 3.5. DETERMINACIONES EN ERITROCITO.

### 3.5.1. Proteínas citosol y membrana.

Se ha llevado a cabo utilizando la técnica de (Lowry *et al*, 1951), basada en dos reacciones complementarias:

-Biuret, característica de grupos  $\text{NH}_3$ , que da color violeta.



-Folin, propia de grupos fenólicos con OH reductores, que da color azul.

El reactivo de Biuret esta constituido por una mezcla 50:1 de solución A ( $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% en una solución de NaOH 0.1 N) y solución B ( $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5% y tartrato sódico al 1%).

Se utilizó un reactivo de Folin comercial, el cual fue diluido a la mitad con agua bidestilada. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Se utilizaron 10  $\mu\text{l}$  de membrana y 15  $\mu\text{l}$  de citosol.

A la muestra se le adicionó 5ml de reactivo de Biuret, se agitó y esperó 15 minutos, al cabo de los cuales se añadieron 0.5 ml del reactivo de Folin, se agitó y se mantuvo 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

La densidad óptica de las muestras (D.O.) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Connecticut, USA) a 640 nm con paquete de software diseñado para el análisis espectrofotométrico UV-Winlab.

La concentración en proteínas se calculó mediante la realización de una curva patrón con albúmina sérica bovina.

### **3.5.2. Medida de la concentración de hidroperóxidos basales e inducidos en membrana de eritrocito.**

La técnica realizada es la de (Jiang, Z.Y., et al, 1992), algo modificada. Se trata de una técnica que se basa en la reacción donde el  $\text{Fe}^{2+}$  reducido pasa  $\text{Fe}^{3+}$  oxidado, de forma que la reacción se caracteriza por una donación de un anión mediado por la acción del reactivo de FOX.

El xilenol orange (XYL. OR.) es un colorante sensible a las oxidaciones del hierro, caracterizándose por presentar un color naranja frente a esos cambios. El caso de hidroperóxidos, esa situación está bien ejemplificada puesto que el hierro actuaría como metal de transición en la peroxidación. Cuanto mayor sea la presencia de hidroperóxidos, mayor será la intensidad del color naranja.

El amonio sulfato ferroso (AMN. SUL.) es la fuente de hierro para la peroxidación, mientras el 2-2-Azobis amidinopropano (AAPH) sería un fuerte inductor de la peroxidación lipídica, así como casi todos los compuestos de tipo azobis.

- **Procedimiento:**

Inicialmente se toman dos tubos para cada muestra ( $T_0$  (Basal) y  $T_1$  (inducido)) de forma que añadimos a esos tubos 100 mg de proteínas. Al tubo  $T_0$  se pone agua hasta 100  $\mu\text{l}$  / ml. Como al final tendremos 2ml adicionamos 200  $\mu\text{l}$ . Al tubo  $T_1$  se añade el inductor AAPH 2,5nM en volumen equivalente a 20  $\mu\text{l}$ , completándose el volumen hasta 200  $\mu\text{l}$  con agua bidestilada. Los dos tubos deben ser incubados a 37 ° C durante 30 minutos.

Tras la incubación añadimos el reactivo de FOX en volumen equivalente a 0,9 ml por ml de volumen final (1,8ml/2ml). Se esperan cerca de 75 minutos, procediéndose, enseguida, a la lectura a 580nm en una cubeta previamente preparada con 3 ml del reactivo de FOX. Primeramente se leen los tubos  $T_0$  y después los tubos  $T_1$ .

El tiempo de espera equivalente a los 75 minutos puede variar de acuerdo con la temperatura del reactivo, de forma que se aconseja que los mismos estén en el frigorífico hasta el momento de su empleo. Otro detalle importante es que, después de someter el espectrofotómetro a un “cero” al aire, la lectura debe ser hecha frente a dos cubetas con los 3 ml de reactivo o al aire con lectura posterior de una cubeta conteniendo los tres ml frente al aire. En el segundo caso la absorbancia final será la diferencia entre la obtenida de leer la muestra y la de leer el reactivo.

- **Interpretación de los resultados:**

La conversión a concentración de hidroperóxidos de la muestra la podemos hacer mediante una curva patrón o empleando el coeficiente de extinción mediante la ley de Lambert- Beer.

La curva patrón es hecha con el tert-butil-hidroperóxido (TBH), que se trata de un reactivo inestable y peligroso. Tal reactivo debe ser guardado en el frigorífico, pues un cambio brusco de temperatura podría hacer que explotara. Los patrones para la curva patrón están establecidos en 0,2  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 2  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; siendo necesario, por tanto hacer las diluciones pertinentes.

Al final tenemos 2 resultados  $T_0$  y  $T_1$

- T<sub>0</sub> nos indica el nivel inicial de hidroperóxidos que hay en la muestra.

-T<sub>1</sub> nos indica cuanto se ha peroxidado la muestra tras la inducción de la reacción de oxidación.

### 3.5.3. Determinación hemoglobina citosol.

La concentración de hemoglobina fue determinada mediante un kit comercial de Quimica Clinica Aplicada (Amposta, España, nº catálogo 994933) basado en el método de la cianometahemoglobina y utilizando el reactivo de Drakkin.

- **Principio del método.**

El Fe (II) de la hemoglobina, oxihemoglobina y carboxihemoglobina es oxidado a Fe (III) por el ferricianuro, dando lugar a la metahemoglobina que, en presencia de ion cianuro, origina la cianmetahemoglobina, compuesto de color rojo y estable, que se puede determinar fotométricamente.

#### -Reactivos:

- 1 Litro de reactivo de Drabkin: con 20 mM de ferricianuro potásico y 43 mM de cianuro potásico.
- 15 ml de estándar de hemoglobina (20g/dl)

#### -Técnica:

- Sangre total heparinizada o con EDTA
- Se mezclan 5 ml de reactivo con 20 µl de sangre, se agita y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente (20-25° C).
- A continuación se lee a 540 nm de absorbancia.
- Se realiza un blanco.
- El estándar se lee directamente sin procesar, es decir, se ponen 5 ml de estándar. También se puede realizar una curva patrón poniendo 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml y 5 ml y completando si es necesario hasta 5 ml con reactivo de drabkin. Equivalen a 4, 8, 12, 16 y 20 g de hemoglobina/100 ml ó 0.2 g, 0.4 g, 0.6g, 0.8g y 1 g de hemoglobina.

#### -Cálculos:

Se puede aplicar una curva patrón o bien la ecuación:

(D.O. muestra/D. O. estándar) \* 20 = g de hemoglobina/dl. Si se quiere pasa a U. I. sería (g/dl)\*0.155=mmol/L. Parece más eficaz la utilización de una curva de calibración, así luego es posible aplicar factores de dilución.

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Conneticut, USA).

### **3.6. DETERMINACIONES EN ORINA.**

#### **3.6.1. Determinación de 8-hidroxi guanosina.**

La determinación de 8-hidroxi guanosina (8-OHdG) en orina fue realizada mediante un kit facilitado por el Japan Institute for the Control of Aging (Shizuoka, Japón).

- **Principio del método.**

Se trata de un inmunoensayo enzimático competitivo. La muestra es añadida a la microplaca junto con un anticuerpo para el 8-OHdG. Este anticuerpo reacciona competitivamente con el 8-OHdG de la muestra y el existente anclado en la microplaca. Por lo tanto, a mayor concentración de 8-OHdG en la muestra menos anticuerpo se une al 8-OHdG anclado en la muestra. Posteriormente se adiciona un anticuerpo secundario marcado con HRP y una solución cromógena y el color determinado. A mayor absorbancia menor concentración en la muestra. Los valores se calculan con una solución estándar de 8-OHdG. El lector de microplacas utilizado es un Sinergy HT de Bio-tek (Vermont, USA) y la longitud de onda a 450 nm.

- **Resumen del ensayo:**

	<b>Estándares</b>	<b>Plasma y control</b>
<b>Estándares (0-5)</b>	50	-
<b>Plasma, control</b>	-	50
<b>8-OHdG anticuerpo</b>	50	50
<b>Incubar</b> 1 hora a 37°C con agitación; <b>Aspirar</b> el contenido de cada pocillo; <b>Lavar</b> 3 veces		
<b>Anticuerpo secundario</b>	100	100
<b>Incubar</b> 1 hora a 37°C con agitación; <b>Aspirar</b> el contenido de cada pocillo; <b>Lavar</b> 3 veces		
<b>Cromógeno</b>	100	100
<b>Incubar</b> 15 minutos con agitación y oscuridad		
<b>Solución parante</b>	100	100
<b>Leer</b> a 450 nm		

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un lector de microplacas (Sinergy HT, Bio-tek (Vermont, USA) a 450 nm.

### 3.6.2. Creatinina.

Para la determinación de creatinina en orina se ha utilizado un kit comercial (Spinreact, Barcelona, España) (Ref. 1001111).

- Principio del método.

El ensayo se basa en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé. Esta reacción da un complejo rojizo cuya intensidad es proporcional a la cantidad de creatinina presente en la muestra. El intervalo de tiempo utilizado permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método.

- Procedimiento.

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda:.....492 nm

Cubeta:.....1 cm paso de luz

Temperatura..... 37 ° C.

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

## 3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ( $\mu\text{L}$ )	--	100	--
Muestra ( $\mu\text{L}$ )	--	--	100

## 4. Mezclar.

5. Leer la absorbancia a 30 segundos ( $A_1$ ) y al cabo de 90 segundos ( $A_2$ ).

6. Calcular el incremento de absorbancia ( $A_2 - A_1$ ).

Las muestras de orina son diluidas 50 veces.

La densidad óptica de las muestras (DO) fue determinada en un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Connecticut, USA).

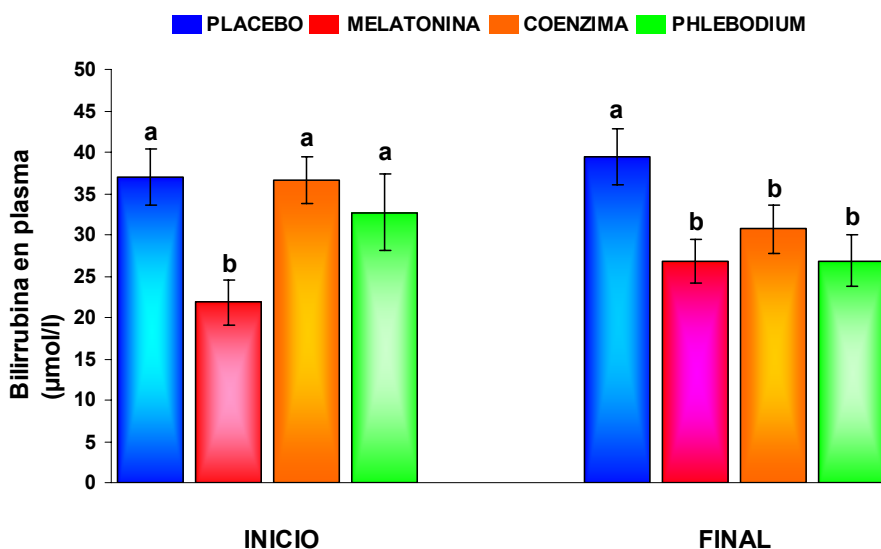
## 1. VARIABLES SANGUÍNEAS.

### 1.1. PARÁMETROS PLASMÁTICOS BIOQUÍMICOS.

#### 1.1.1 Bilirrubina total:

En la tabla de descriptivos (tabla III.1.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática de bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico (gráfico III.1):



**Gráfico III.1.** - Concentración plasmática de bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.2). Los niveles de significación obtenidos en el grupo placebo ( $p=0,62$ ), grupo melatonina ( $p=0,21$ ), grupo coenzima ( $p=0,17$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,31$ ) son mayores del nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas

para la concentración plasmática de bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ) en ambos periodos de tiempo, para cada uno de los grupos.

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico). Veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.3). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico son  $p=0,231$  y  $p=0,557$ , siendo ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio y al final del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA al inicio del ejercicio físico, el nivel de significación obtenido (tabla III.4),  $p=0,015$  es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores plasmáticos de bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En la prueba DMS (tabla III.5.), los niveles de significación obtenidos para el grupo melatonina con respecto al grupo placebo ( $p=0,005$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,006$ ), y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,035$ ), son menores que el nivel mínimo de significación  $\alpha=0,05$ , lo que nos indica que rechazamos la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los grupos, y que por tanto, sí existen diferencias significativas entre el grupo melatonina con respecto al resto de los grupos para los valores plasmáticos de bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ) al inicio del ejercicio (antes de iniciarse la carrera).

Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.6.) en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,012$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,999$ ), y con respecto al



grupo *Phlebodium* ( $p=0,713$ ), nos indican la existencia de diferencias significativas entre el grupo placebo y el grupo melatonina, no existiendo tales diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto a los grupos coenzima y *Phlebodium* para los valores plasmáticos de bilirrubina al inicio del ejercicio.

En la t de Dunnett (tabla III.6), los niveles de significación obtenidos del grupo placebo con respecto al grupo coenzima ( $p=0,999$ ) y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,713$ ) son mayores que  $\alpha=0,05$ , lo que indica que aceptamos la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre estos grupos al inicio del ejercicio.

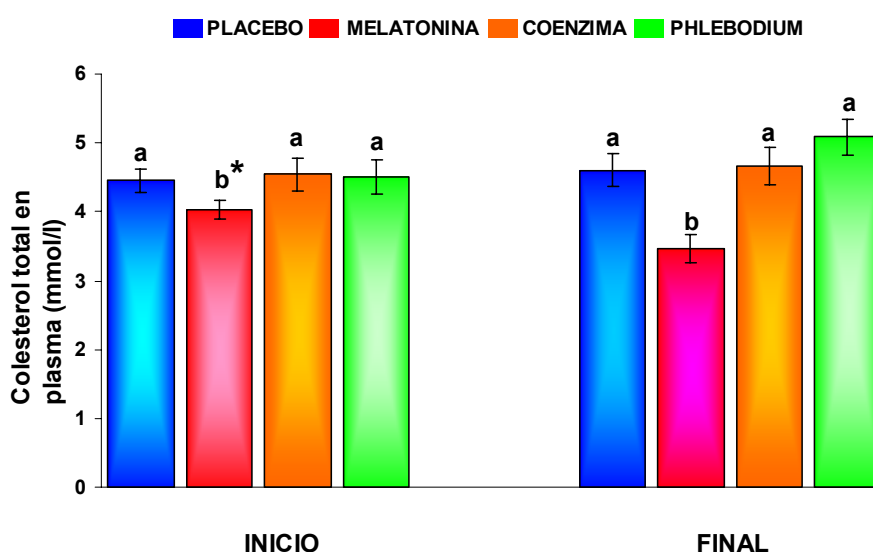
En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.7) el nivel de significación obtenido  $p= 0,02$ , es menor del nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, si existen diferencias significativas para los valores plasmáticos de bilirrubina entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc, en las que se realizan comparaciones múltiples y se compara cada grupo con el resto de los grupos. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

Las pruebas post hoc (DMS y t de Dunnett, tabla III.8 y tabla III.9, respectivamente) nos indican que sí existen diferencias significativas. En concreto, en la prueba DMS (tabla III.8.), los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,006$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,051$ ) y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,007$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha= 0,05$ , lo que nos indica que rechazamos la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los grupos, y que por tanto, existen diferencias significativas entre el grupo placebo con respecto al resto de los grupos para los valores plasmáticos de bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ) al final del ejercicio (después de terminar la carrera). No existen diferencias significativas entre los grupos melatonina, coenzima y *Phlebodium*, ya que en las comparaciones múltiples sus niveles de significación son mayores que  $\alpha=0,05$ .

### 1.1.2. Colesterol total en plasma:

En la tabla de descriptivos (tabla III.10.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática de colesterol total en plasma (mmol/l) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.2.-** Concentración plasmática de colesterol (mmol/l). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.11). Los niveles de significación obtenidos en los grupos placebo ( $p=0,60$ ), coenzima ( $p=0,75$ ) y *Phlebodium* ( $p=0,12$ ), son mayores del nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para la concentración plasmática de colesterol total (mmol/l) en cada uno de esos grupos entre ambos periodos de tiempo. Sin embargo, el nivel de significación obtenido para el grupo melatonina ( $p=0,03$ ) es menor que  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula y podemos afirmar que sí

existen diferencias significativas para este grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.12.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene ( $p=0,069$ ) y ( $p=0,405$ ) respectivamente, son ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.13.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,267$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos para los valores medios de colesterol total en plasma (mmol/l) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.14.) el nivel de significación obtenido ( $p= 0,001$ ), es menor del nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de colesterol total en plasma (mmol/l) entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc, en las que se realizan comparaciones múltiples entre los grupos. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

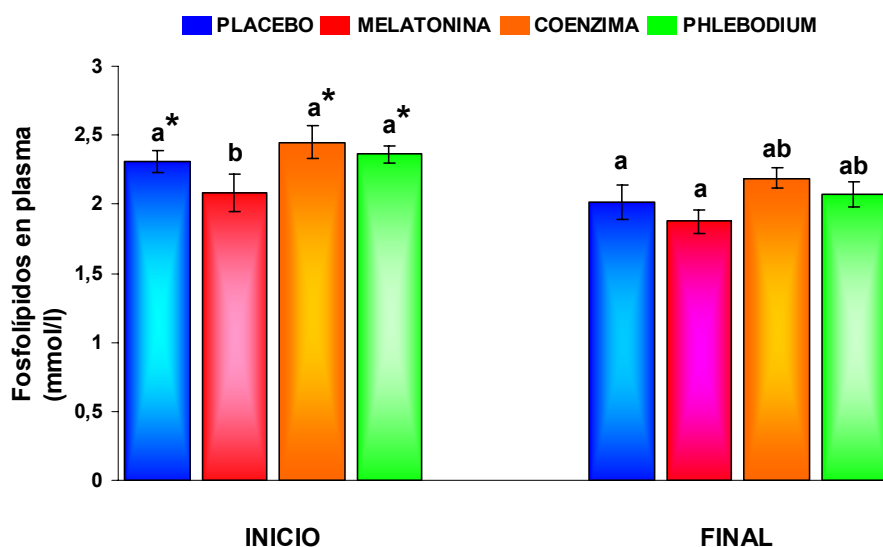
En las pruebas post hoc (prueba DMS y t de Dunnett, tabla III.15 y tabla III.16, respectivamente), los niveles de significación obtenidos nos indican que sí existen diferencias significativas el grupo melatonina con respecto al resto de los grupos al final del ejercicio (después de la carrera). En concreto, en la prueba DMS (tabla III.15.), los niveles de significación obtenidos para el grupo melatonina con respecto al grupo

placebo ( $p=0,002$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,003$ ) y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,000$ ), son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha=0,05$ , lo que nos indica que rechazamos la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los grupos, y que por tanto, existen diferencias significativas entre el grupo melatonina con respecto al resto de los grupos para los valores plasmáticos de colesterol total (mmol/l) al final del ejercicio (después de la carrera). No existen diferencias significativas entre los grupos placebo, coenzima y *Phlebodium*, ya que sus niveles de significación en las comparaciones múltiples son mayores que el nivel mínimo de significación fijado de  $\alpha=0,05$ .

### 1.1.3. Fosfolípidos:

En la tabla de descriptivos (tabla III.17.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática de colesterol total en plasma (mmol/l) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.3.-** Concentración plasmática de fosfolípidos (mmol/l). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p<0.05$ ). \* indica existencia de diferencias para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p<0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.18.). Los niveles de significación obtenidos para el grupo *Phlebodium* ( $p=0,01$ ) son menores que el nivel de significación mínimo fijado de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre ambos periodos de tiempo. Por tanto, sí existen claramente diferencias estadísticamente significativas para el grupo *Phlebodium* entre el inicio y el final del ejercicio.

Los niveles de significación de los grupos placebo ( $p=0,06$  y  $p=0,07$ ) y coenzima ( $p=0,08$  y  $p=0,09$ ) son mayores ligeramente que el nivel de significación mínimo fijado  $\alpha = 0,05$ , pero ya que se aproximan a esa cantidad, no podemos afirmar con rotundidad que existen diferencias significativas entre ambos periodos de tiempo.

Sin embargo, el nivel de significación para el grupo melatonina, ( $p=0,22$ ), si que nos permite aceptar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas para este grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.19.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene ( $p=0,101$  y  $p=0,117$ , respectivamente) son ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.20.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,093$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores medios de fosfolípidos en plasma (mmol/l) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

Dado que el nivel de significación obtenido se aproxima al nivel mínimo de significación estudiamos las diferencias entre los grupos con una prueba post hoc, en concreto, con una prueba DMS (tabla III.21.). Observamos que sí existen diferencias significativas entre los grupos melatonina y coenzima ya que el nivel de significación obtenido es ( $p=0,017$ ), menor que el nivel mínimo de significación fijado de  $\alpha=0,05$ . Para el grupo melatonina se obtiene un nivel de significación ( $p=0,06$ ), con respecto al grupo *Phlebodium* que se aproxima al nivel mínimo de significación lo que podría indicar diferencias significativas entre ambos grupos.

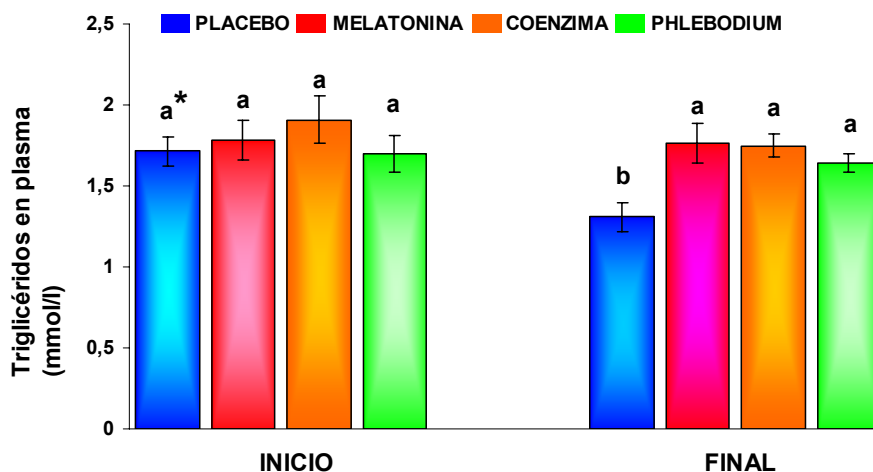
En la prueba ANOVA para el final del ejercicio físico (tabla III.22.) el nivel de significación obtenido  $p= 0,154$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de fosfolípidos en plasma (mmol/l) entre los distintos grupos al final del ejercicio.

Sin embargo, realizando la prueba DMS (tabla III.23.), obtenemos un nivel de significación de  $p=0,02$  para el grupo melatonina con respecto al grupo coenzima, valor inferior a  $\alpha=0,05$ , lo que indica que sí existen diferencias significativas entre ambos grupos al final del ejercicio, no existiendo diferencias significativas entre los grupos placebo, coenzima y *Phlebodium*.

#### **1.1.4. Triglicéridos:**

En la tabla de descriptivos (tabla III.24.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática de triglicéridos (mmol/l) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.4.-** Concentración plasmática de triglicéridos (mmol/l). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.25.). Los niveles de significación obtenidos en los grupos melatonina ( $p=0,94$ ), grupo coenzima ( $p=0,34$ ), grupo *Phlebodium* ( $p=0,67$ ) son mayores del nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para la concentración plasmática de triglicéridos (mmol/l) en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo. Sin embargo, para el grupo placebo el nivel de significación obtenido ( $p=0,00$ ) es menor que  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que si existen diferencias significativas para este grupo entre ambos periodos de tiempo.

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.26.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene ( $p=0,506$  y  $p=0,130$ , respectivamente) son ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro

grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA al inicio del ejercicio físico (tabla III.27.), el nivel de significación obtenido  $p=0,588$  es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de triglicéridos en plasma entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.28.), el nivel de significación obtenido  $p=0,004$ , es menor del nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de triglicéridos en plasma entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc, en las que se realizan comparaciones múltiples de una variable entre grupos y se compara cada grupo con el resto. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

Las pruebas post hoc (DMS y t de Dunnett, tabla III.29. y tabla III.30., respectivamente), nos indican que sí existen diferencias significativas. Los niveles de significación obtenidos en la prueba DMS (tabla III.29.), para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,001$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,002$ ) y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,013$ ) son valores menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha=0,05$ , lo que nos indica que rechazamos la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los grupos, y que por tanto, existen diferencias significativas entre el grupo placebo con respecto al resto de los grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.30.), en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,003$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,004$ ), y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,034$ ), lo que nos indica diferencias significativas entre el grupo placebo con respecto a los otros tres grupos para los valores plasmáticos de triglicéridos (mmol/l) al final del ejercicio.

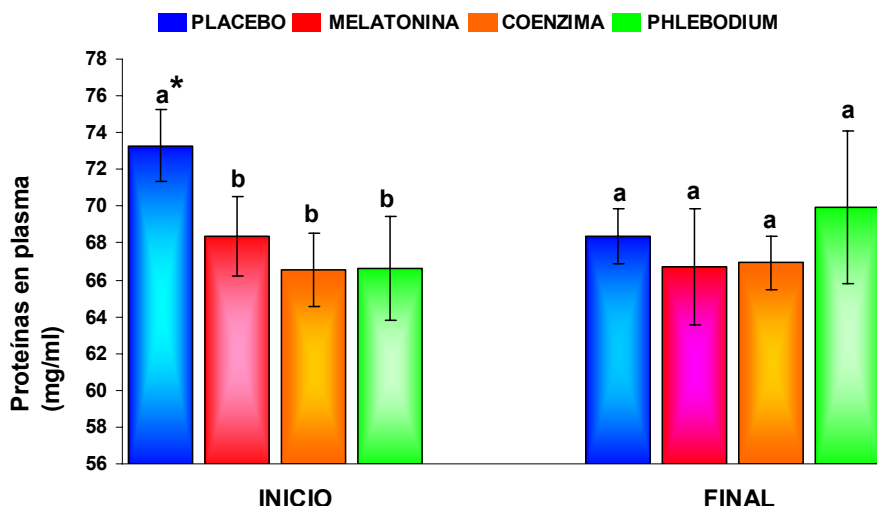


En las comparaciones múltiples analizando los niveles de significación podemos apreciar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos melatonina, coenzima y *Phlebodium* para los valores de triglicéridos en plasma (mmol/l) al final del ejercicio.

### 1.1.5. Proteínas totales en plasma:

En la tabla de descriptivos (tabla III.31.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática de proteínas totales (mg/ml) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III. 5.-** Concentración plasmática de proteínas (mg/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Es destacable observar en el gráfico el error estándar tan grande en los grupos, lo que significa que existe una mayor variabilidad dentro de ellos. Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.32.). Los niveles de significación obtenidos en los grupos melatonina ( $p=0,66$ ), grupo coenzima ( $p=0,87$ ) y *Phlebodium* ( $p=0,52$ ) son

mayores del nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para la concentración plasmática de proteínas en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo. En el grupo placebo el nivel de significación obtenido ( $p=0,06$ ) es ligeramente mayor a  $\alpha=0,05$ , pero ya que se aproxima a ese nivel mínimo de significación, no podemos afirmar con rotundidad que existen diferencias estadísticamente significativas para el grupo placebo entre ambos periodos de tiempo.

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.33.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas para la concentración plasmática de proteínas al inicio del ejercicio ya que el nivel de significación obtenido en la prueba de Levene es de  $p=0,720$ , siendo mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, se asume la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. No ocurre igual con la prueba de homogeneidad de varianzas al final del ejercicio cuyo nivel de significación es  $p=0,042$ , por lo que aplicaremos una prueba Welch (prueba de igualdad de las medias pero sin asumir igualdad de varianzas entre los grupos). Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.34.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,144$  es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores plasmáticos de proteínas (mg/ml) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio. Sin embargo, realizando una prueba DMS (tabla III.35.) de comparaciones múltiples entre grupos los niveles de significación que obtenemos del grupo placebo con respecto al grupo melatonina es  $p=0,137$ , respecto al grupo coenzima es  $p=0,044$  y respecto al grupo *Phlebodium* es de  $p=0,048$ , lo que nos indica que si existen diferencias significativas entre el grupo placebo con respecto a los grupos coenzima y *Phlebodium* al inicio del ejercicio.

En la prueba Welch al final del ejercicio físico (tabla III.36.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,846$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado

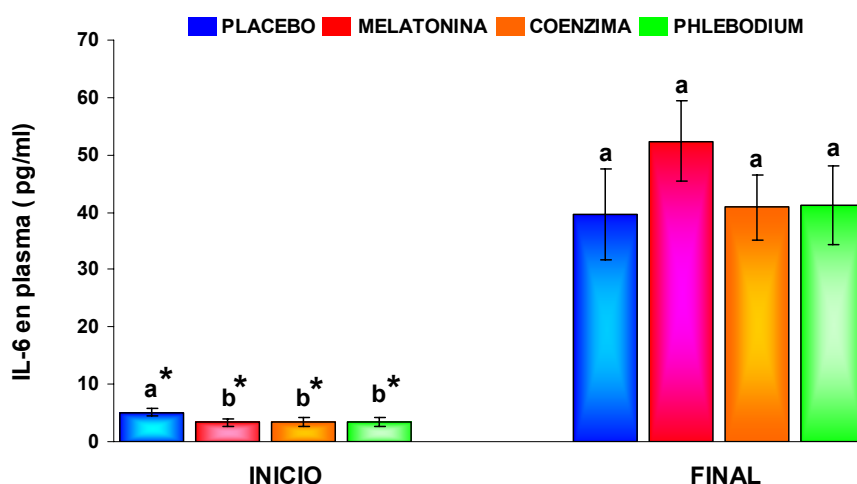
$\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de proteínas en plasma entre los distintos grupos al final del ejercicio.

## 1.2. PARÁMETROS PLASMÁTICOS INFLAMATORIOS.

### 1.2.1. Interleukina 6:

En la tabla de descriptivos (tabla III.37.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática de interleukina-6 (pg/ml) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III. 6.-** Concentración plasmática de interleukina-6 (pg/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p<0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p<0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.38.). Los niveles de significación obtenidos en el grupo placebo ( $p=0,00$ ), grupo melatonina ( $p=0,00$ ), grupo coenzima ( $p=0,00$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,00$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de

que sí existen diferencias significativas para la concentración plasmática de interleukina-6 en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.39.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico ( $p=0,792$  y  $p=0,850$ , respectivamente) son mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, se asume la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

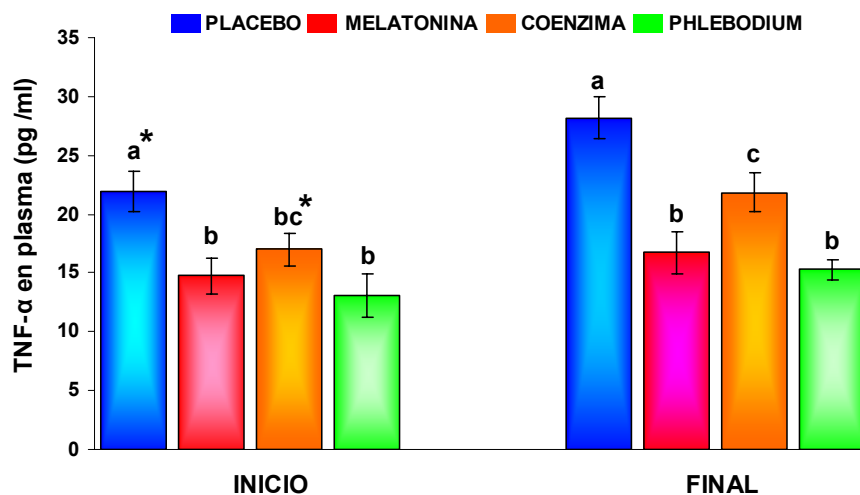
En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.40.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,285$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de interleukina-6 en plasma (pg/ml) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.41.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,538$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de interleukina-6 en plasma (pg/ml) entre los distintos grupos al final del ejercicio.

### 1.2.2. TNF- $\alpha$ :

En la tabla de descriptivos (tabla III.42.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática de TNF- $\alpha$  (pg/ml) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.7.-** Concentración plasmática de TNF- $\alpha$  (pg/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* Indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para apreciar si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.43.). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.72.) en el grupo placebo ( $p=0,02$ ) y grupo coenzima ( $p=0,04$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que sí existen diferencias significativas para la concentración plasmática de TNF- $\alpha$  en cada uno de esos grupos entre ambos periodos de tiempo. Sin embargo, los niveles de significación para el grupo melatonina ( $p=0,40$ ) y el grupo Phlebodium ( $p=0,29$  y  $p=0,30$ ) son mayores que  $\alpha=0,05$ , por lo que aceptamos la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para esos grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.44.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico son de  $p=0,807$  y  $p=0,262$ , siendo ambos mayores que nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de

los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA al inicio del ejercicio físico (tabla III.45.), el nivel de significación obtenido  $p=0,004$  es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de TNF- $\alpha$  entre los distintos grupos al inicio del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS.

En la prueba DMS (tabla III.46.), los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,004$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,039$ ), y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,001$ ) siendo menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto a los restantes tres grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.47.), el nivel de significación obtenido  $p=0,000$ , es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En la prueba DMS (tabla III.48.), los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,000$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,008$ ), y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,000$ ) han sido menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar

la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto al resto de los grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

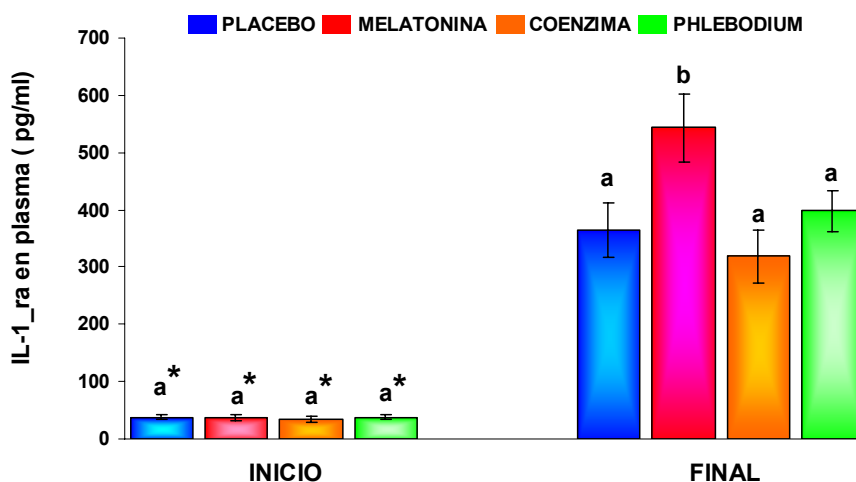
Además, observando las comparaciones múltiples en dicha tabla III.48, se constatan diferencias significativas entre el grupo coenzima con respecto al grupo melatonina ( $p=0,029$ ) y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,006$ ) al ser valores inferiores a  $\alpha=0,05$ . No existen diferencias significativas entre los grupos melatonina y *Phlebodium* al inicio del ejercicio físico ni tampoco al final del ejercicio físico ( $p=0,514$ ).

Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.49.) en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,000$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,023$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,000$ , lo que nos indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo placebo y los otros tres grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

### 1.2.3. Receptor antagonista de la interleukina-1:

En la tabla de descriptivos (tabla III.50.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática del receptor antagonista de la interleukina-1 (pg/ml) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.8.-** Concentración plasmática del receptor antagonista de la interleukina-1 (pg/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo

de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempo ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.51.). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.64.) en el grupo placebo ( $p=0,00$ ), grupo melatonina ( $p=0,00$ ), grupo coenzima ( $p=0,00$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,00$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que si existen diferencias significativas para la concentración plasmática del receptor antagonista de la interleukina-1 en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio) o (final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.52.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico ( $p=0,824$  y  $p=0,261$ , respectivamente) son ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA para el final del ejercicio físico (tabla III.53.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,897$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores del receptor antagonista de la interleukina-1 en plasma (pg/ml) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.54.) el nivel de significación obtenido,  $p= 0,017$  es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, si existen diferencias significativas para los valores del receptor antagonista de la interleukina-1 en plasma



entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

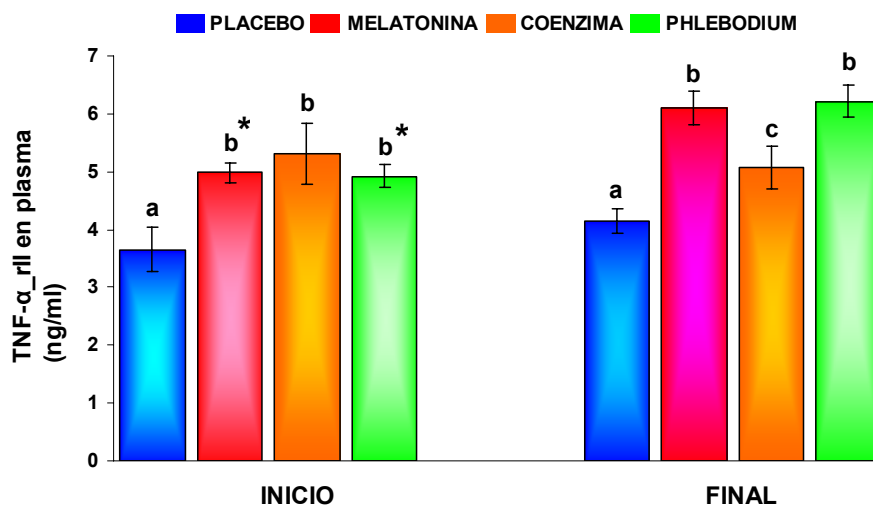
En la prueba DMS (tabla III.55.), los niveles de significación obtenidos para el grupo melatonina con respecto al grupo placebo ( $p=0,014$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,003$ ), y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,042$ ) son menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que nos indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo melatonina con respecto al resto de los grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.56.) en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,037$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,836$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,931$ , lo que nos indica diferencias significativas entre el grupo placebo y el grupo melatonina, no existiendo tales diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto a los grupos coenzima y *Phlebodium* al final del ejercicio.

#### **1.2.4. Receptor soluble II del TNF- $\alpha$ :**

En la tabla de descriptivos (tabla III.57.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática del receptor soluble II del TNF- $\alpha$  (ng/ml) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.9.-** Concentración plasmática del receptor soluble II del TNF- $\alpha$  (ng/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.58.). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.) en el grupo melatonina ( $p=0,00$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,00$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que si existen diferencias significativas para la concentración plasmática del receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en cada uno de esos grupos entre ambos periodos de tiempo. Sin embargo, los niveles de significación para el grupo placebo ( $p=0,27$ ) y el grupo coenzima ( $p=0,72$ ) son mayores que  $\alpha=0,05$ , por lo que aceptamos la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para esos

grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.59.). No se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas al inicio del ejercicio físico ya que el nivel de significación obtenido en la prueba de Levene es de  $p=0,014$ , siendo menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, no se asume la igualdad de varianzas y aplicamos

una prueba Welch. En la prueba de Levene al final del ejercicio sí se asume la igualdad de varianzas ya que el nivel de significación es  $p=0,320$ , mayor que  $\alpha=0,05$ , por lo que aplicaremos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

El nivel de significación obtenido en la prueba Welch al inicio del ejercicio físico (tabla III.60.),  $p=0,044$  es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores del receptor soluble II del TNF- $\alpha$  entre los distintos grupos al inicio del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En la prueba DMS (tabla III.61.) los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,013$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,003$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,017$  han sido menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto a los restantes tres grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.62.), en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,034$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,007$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,045$ , lo que nos indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo placebo y los otros tres grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.63.), el nivel de significación obtenido  $p=0,000$  es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores del receptor soluble II del TNF- $\alpha$  entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias

entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En la prueba DMS (tabla III.64.) los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,000$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,034$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,000$  han sido menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que nos indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto al resto de los grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

Además, observando las comparaciones múltiples en dicha tabla III.64, se constatan diferencias significativas entre el grupo coenzima con respecto al grupo melatonina  $p=0,020$  y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,010$  al ser valores inferiores a  $\alpha=0,05$ . No existen diferencias significativas entre los grupos melatonina y *Phlebodium* ( $p=0,776$ ) al final del ejercicio físico.

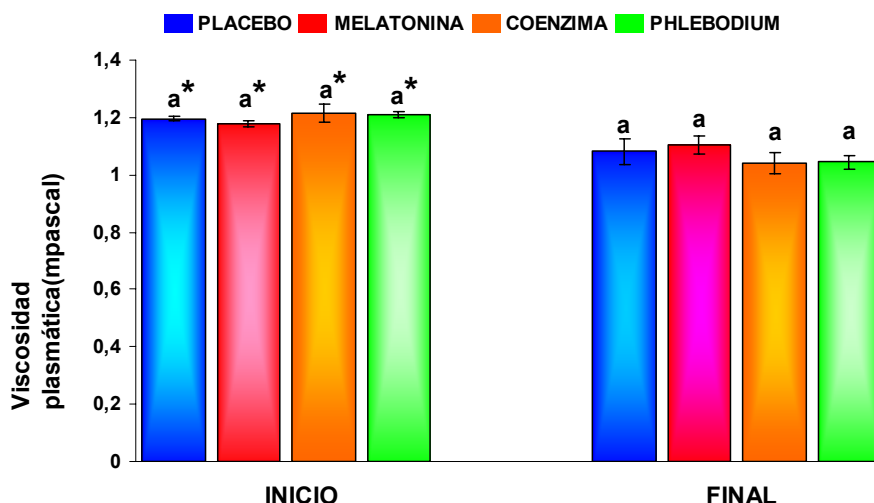
Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.65.) en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,000$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,085$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,000$ , lo que nos indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo placebo y los otros tres grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

### **1.3. OTRAS DETERMINACIONES EN PLASMA.**

#### **1.3.1. Viscosidad plasmática:**

En la tabla de descriptivos (tabla III.66.) los valores medios que se obtienen para la viscosidad plasmática (mpascal) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.10.-** Viscosidad plasmática (mpascal). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* Indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.67.). Los niveles de significación obtenidos en el grupo placebo ( $p=0,02$  y  $p=0,04$ ), grupo melatonina ( $p=0,03$ ), grupo coenzima ( $p=0,00$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,00$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que si existen diferencias significativas para la concentración de viscosidad plasmática (mpascal) en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos

grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.68.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas para la viscosidad plasmática al inicio del ejercicio ya que el nivel de significación obtenido en la prueba de Levene es de  $p=0,056$ , siendo mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, se asume la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. No ocurre igual con la prueba de homogeneidad de varianzas al final del ejercicio cuyo nivel de significación es  $p=0,020$ , por lo que aplicaremos una prueba Welch. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro

grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

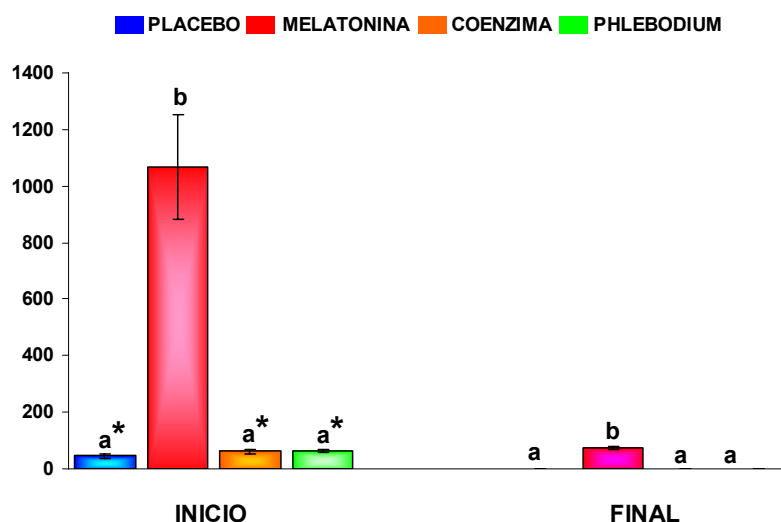
En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.69.), el nivel de significación obtenido  $p=0,490$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de viscosidad en plasma entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

En la prueba Welch al final del ejercicio físico (tabla III.70.), el nivel de significación obtenido  $p=0,486$  es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de viscosidad plasmática entre los distintos grupos al final del ejercicio.

### 1.3.2. Melatonina:

En la tabla de descriptivos (tabla III.71.) los valores medios que se obtienen para la concentración plasmática melatonina (pg/ml) difieren:

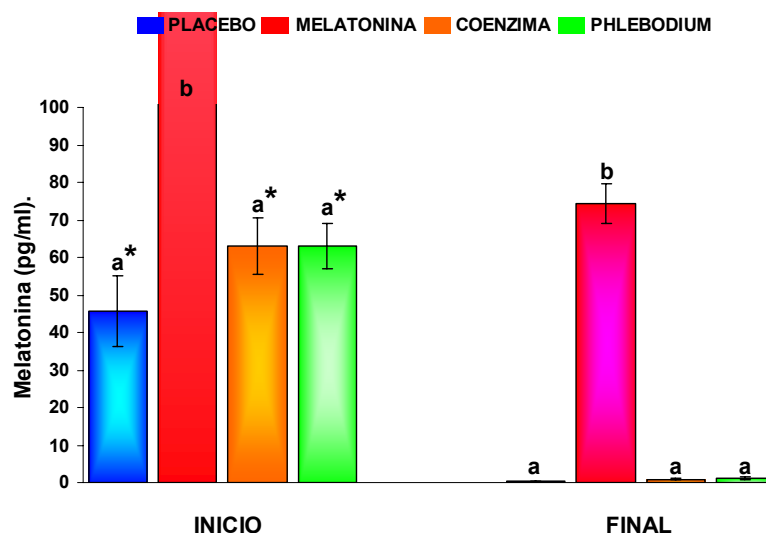
- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



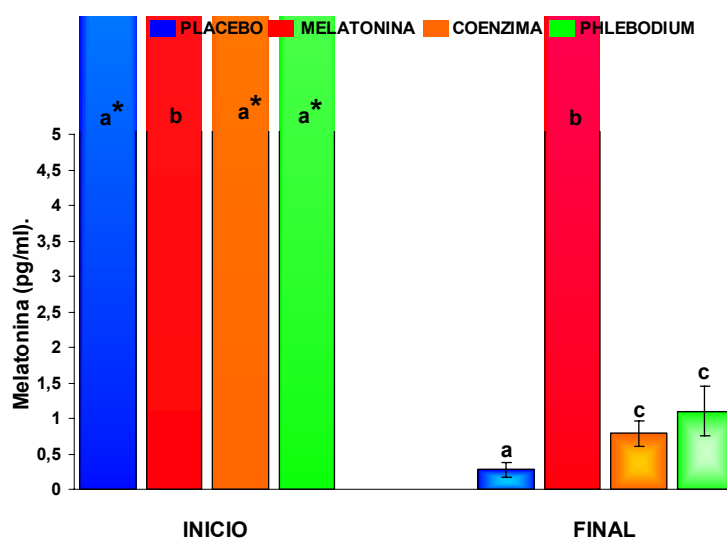
**Gráfico III.11.a.-** Melatonina en plasma (pg/ml) (escala 1-1400). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica

existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* Indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Como podemos apreciar en el gráfico III.11, las diferencias entre los grupos de los valores plasmáticos de melatonina (pg/ml) al final del ejercicio son tan considerables que no aparecen representados los grupos placebo, coenzima y *Phlebodium*, por lo que realizamos gráficos con distintas escalas para facilitar su visualización:



**Gráfico III.11.b.** Melatonina en plasma (pg/ml) (escala 1-100). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).



**Gráfico III.11.c.** Melatonina en plasma (pg/ml) (escala 1-5). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (n=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica

existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.72.). Los niveles de significación obtenidos en el grupo placebo ( $p=0,00$ ), grupo melatonina ( $p=0,00$ ), grupo coenzima ( $p=0,00$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,00$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que sí existen diferencias significativas para la concentración plasmática de melatonina en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.73.). No se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas para la concentración plasmática de melatonina ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico ( $p=0,00$  y  $p=0,00$ , respectivamente) son menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, no se asume la igualdad de varianzas, por lo que aplicaremos una prueba Welch. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba Welch al inicio del ejercicio físico (tabla III.74.) el nivel de significación obtenido  $p= 0,001$ , es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de melatonina entre los distintos grupos al inicio del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc, en las que se realizan comparaciones múltiples de cada grupo respecto a los demás. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.



Las pruebas post hoc (DMS y t de Dunnett, tabla III.75. y tabla III.76., respectivamente) nos indican que sí existen diferencias significativas para el grupo melatonina con respecto a los otros grupos.

En la prueba DMS (tabla III.75.), los niveles de significación del grupo melatonina con respecto a los otros tres grupos son en cada caso ( $p=0,000$ ), menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo melatonina con respecto a los grupos placebo, coenzima y *Phlebodium* para los valores plasmáticos de melatonina (pg/ml) al inicio del ejercicio (antes de la carrera). Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.76.).

Fijándonos en los niveles de significación de la tabla III.75., observamos que no existen diferencias significativas entre los grupos placebo, coenzima y *Phlebodium* entre sí.

En la prueba Welch al final del ejercicio físico (tabla III.77.),  $p=0,000$  es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores plasmáticos de melatonina (pg/ml) entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc, en las que se realizan comparaciones múltiples de cada grupo respecto a los demás. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En las pruebas post hoc (tabla III.78. y tabla III.79., respectivamente), los niveles de significación obtenidos para el grupo melatonina con respecto de los otros tres grupos también tienen el valor de  $p=0,000$ , menor que  $\alpha=0,05$  lo que indica que rechazamos la hipótesis nula. Por tanto, en la comparaciones múltiples observamos que existen diferencias significativas entre el grupo melatonina con respecto a los otros grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

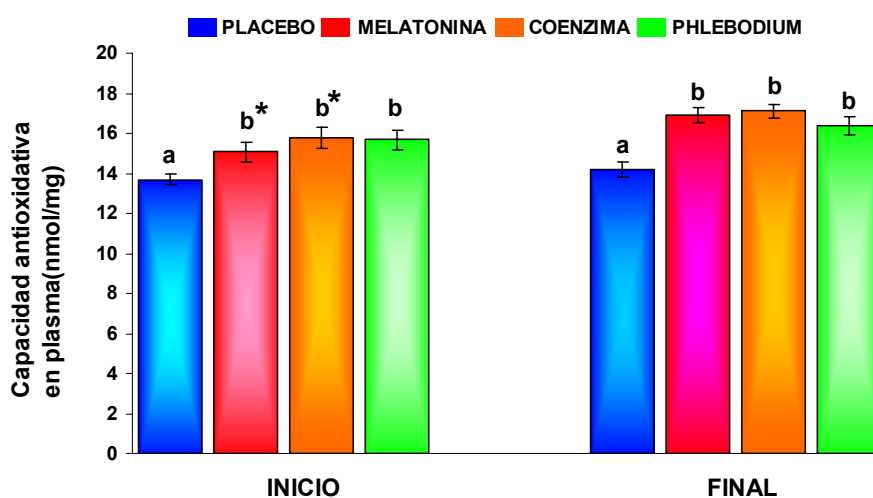
En la prueba DMS (tabla III.78.), los niveles de significación del grupo

melatonina con respecto a los otros tres grupos son en cada caso ( $p=0,000$ ), menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo melatonina con respecto a los grupos placebo, coenzima y *Phlebodium* para los valores plasmáticos de melatonina (pg/ml) al final del ejercicio (después de la carrera). Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.79.).

### 1.3.3. Capacidad antioxidativa en plasma.

En la tabla de descriptivos (tabla III.80.) los valores medios que se obtienen para la capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III. 12.-** Capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p<0.05$ ). \* Indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p<0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.81.). Los niveles de significación obtenidos en el grupo placebo ( $p=0,30$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,33$ ) son

mayores del nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para la capacidad antioxidativa en plasma en cada uno de esos grupos entre ambos periodos de tiempo.

No obstante, los niveles de significación en el grupo melatonina ( $p=0,00$  y  $p=0,01$ ) son menores que  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula y por tanto, si existen diferencias significativas para este grupo entre ambos periodos de tiempo. Para el grupo coenzima ( $p=0,05$ ), es igual al valor del nivel mínimo de significación fijado, por lo que no podemos afirmar con rotundidad que existen diferencias significativas en dicho grupo entre ambos periodos de tiempo.

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico). Veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.82.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianza ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al

inicio y final del ejercicio físico ( $p=0,293$  y  $p=0,946$ , respectivamente) son ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA al inicio del ejercicio físico (tabla III.83.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,009$ , es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, si existen diferencias significativas para los valores de capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS.

En la prueba DMS (tabla III.84.), los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,040$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,003$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,004$  han sido menores que

el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto si existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto al resto de los grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.85.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,000$ , es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, si existen diferencias significativas para los valores de capacidad antioxidativa en plasma entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En las pruebas post hoc (DMS y t de Dunnett, tabla III.86. y tabla III.87., respectivamente) los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con

respecto de los otros tres grupos tienen el valor de  $p=0,000$ , son menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que rechazamos la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas. Por tanto, en las comparaciones múltiples observamos que existen diferencias significativas entre el grupo placebo con respecto a los otros grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

No existen diferencias significativas entre los grupos melatonina, coenzima y *Phlebodium* para los valores plasmáticos de capacidad antioxidativa al final del ejercicio físico.

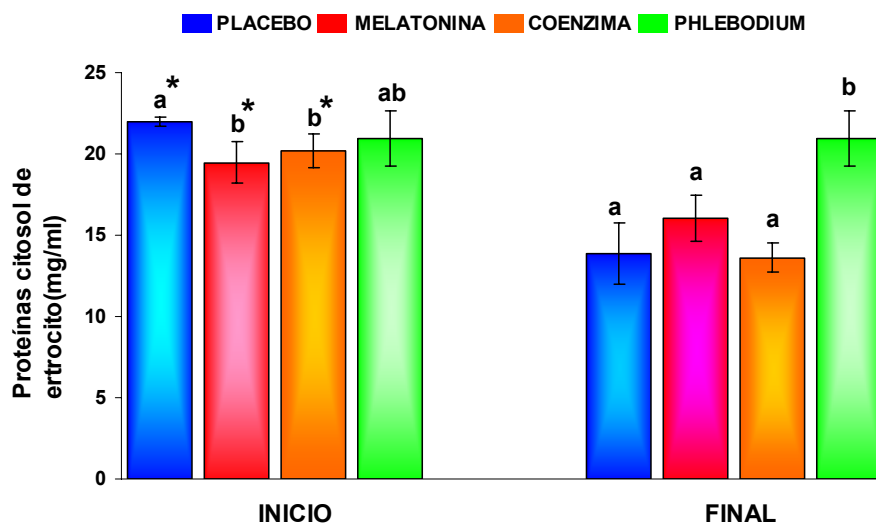
## **1.4. PARÁMETROS ERITROCITARIOS.**

### **1.4.1. Proteínas citosol de eritrocito:**

En la tabla de descriptivos (tabla III.88.) los valores medios que se obtienen para la concentración de proteínas de citosol de eritrocito (mg/ml) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).

- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.13.-** Concentración de proteínas citosol de eritrocito (mg/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.89.). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.89.) en el grupo placebo ( $p=0,00$ ) y grupo coenzima ( $p=0,00$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que sí existen diferencias significativas para la concentración de proteínas citosol de eritrocito en cada uno de esos grupos entre ambos periodos de tiempo. Sin embargo, los niveles de significación para el grupo melatonina ( $p=0,09$ ) y el grupo *Phlebodium* ( $p=1,00$ ) son mayores que  $\alpha=0,05$ , por lo que aceptamos la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para esos grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.90.). No se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas al inicio del ejercicio físico ya que el nivel de significación

obtenido en la prueba de Levene es de  $p=0,031$ , siendo menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, no se asume la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba Welch. En la prueba de Levene al final del ejercicio sí se asume la igualdad de varianzas ya que el nivel de significación es  $p=0,180$ , mayor que  $\alpha=0,05$ , por lo que aplicaremos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba Welch para el inicio del ejercicio físico (tabla III.91.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,174$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos para los valores de proteínas en citosol de eritrocito (mg/ml) al inicio del ejercicio (antes de comenzar la carrera).

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.92.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,007$  es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de proteínas en citosol de eritrocito entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En la prueba DMS (tabla III.93.), los niveles de significación obtenidos para el grupo *Phlebodium* con respecto al grupo placebo ( $p=0,003$ ), con respecto al grupo melatonina ( $p=0,030$ ), y con respecto al grupo coenzima ( $p=0,002$ ) son menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que nos indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *Phlebodium* con respecto al resto de los grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

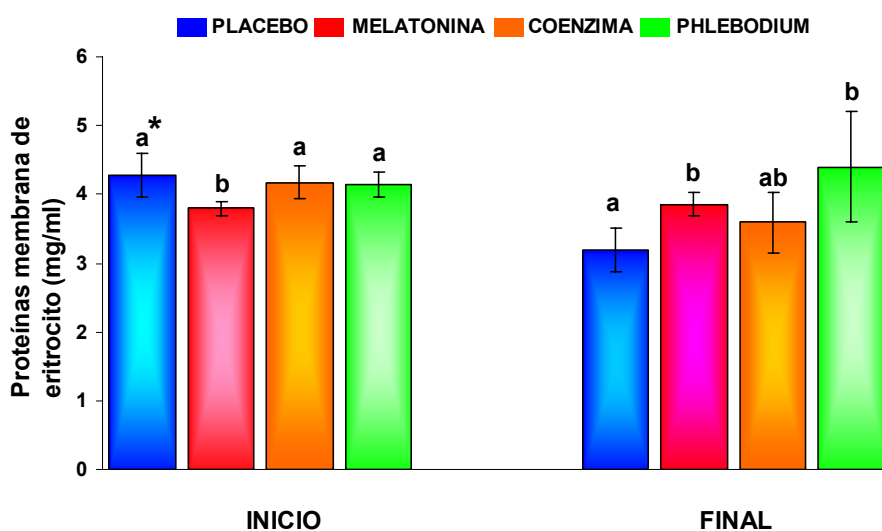
Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.94.), en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,638$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,999$ , y con respecto al grupo

*Phlebodium*  $p=0,008$ , lo que nos indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo placebo y el grupo *Phlebodium* al final del ejercicio (después de la carrera).

#### 1.4.2. Proteínas membrana de eritrocito:

En la tabla de descriptivos (tabla III.100.) los valores medios que se obtienen para la concentración de proteínas membrana de eritrocito (mg/ml) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.14.-** Concentración de proteínas de membrana de eritrocito (mg/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p<0.05$ ). \* indica la existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p<0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.101). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.101.) en el grupo melatonina ( $p=0,76$ ), grupo coenzima ( $p=0,27$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,75$  y  $p=0,77$ ) son mayores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para la concentración de proteínas en membrana de eritrocito en cada uno de esos grupos entre ambos periodos de tiempo,

(inicio y final del ejercicio físico). En el grupo placebo, el nivel de significación ( $p=0,03$ ) es menor que el nivel mínimo de significación fijado, por lo que aceptamos que sí existen diferencias estadísticamente significativas para tal grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.102.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas al inicio del ejercicio físico ya que el nivel de significación obtenido en la prueba de Levene es de  $p=0,273$ , siendo mayor que el nivel mínimo de significación

fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, se asume la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. En la prueba de Levene al final del ejercicio físico el nivel de significación obtenido es  $p=0,017$ , menor que  $\alpha=0,05$  por lo que no se asume la igualdad de varianzas y aplicaremos una prueba Welch. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.103.) el nivel de significación obtenido  $p= 0,480$  es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de proteínas de membrana de eritrocito (mg/ml) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

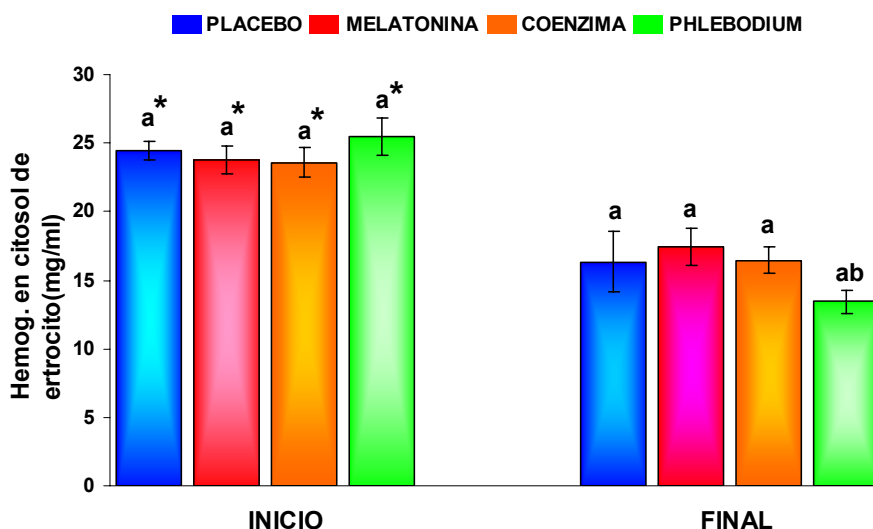
En la prueba Welch para el final del ejercicio físico (tabla III.104.) el nivel de significación obtenido  $p= 0,328$  es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de proteínas membrana de eritrocito entre los distintos grupos al final del ejercicio.

#### **1.4.3. Hemoglobina en citosol de eritrocito:**

En la tabla de descriptivos (tabla III.95.) los valores medios que se obtienen para la concentración de hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) difieren:



- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.15.-** Concentración de hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.96.). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.96.) en el grupo placebo ( $p=0,00$ ), grupo melatonina ( $p=0,00$ ), grupo coenzima ( $p=0,00$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,00$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que si existen diferencias significativas para la concentración de hemoglobina en citosol de eritrocito en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.97.).

Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianza ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico ( $p=0,639$  y  $p=0,127$ , respectivamente) son ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

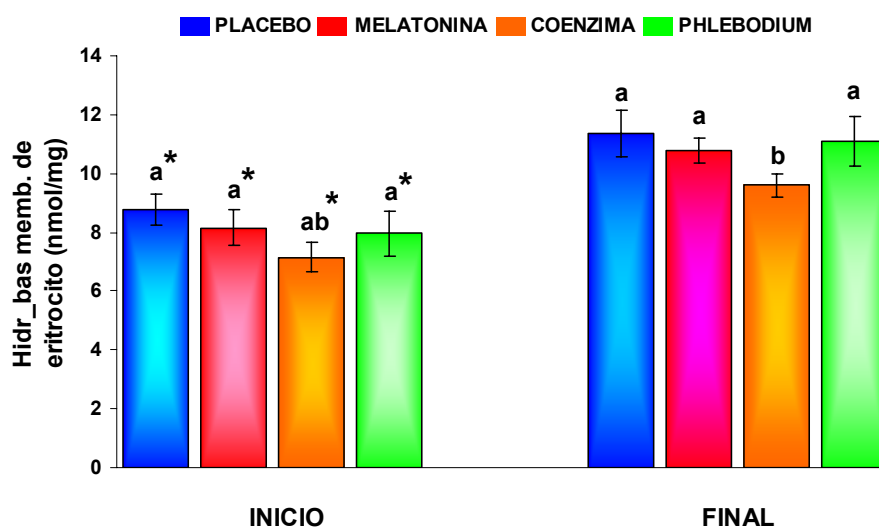
En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.98.)  $p= 0,611$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

En la prueba ANOVA para el final del ejercicio físico (tabla III.99.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,258$  es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) entre los distintos grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

#### **1.4.4. Hidroperóxidos en membrana de eritrocito basales:**

En la tabla de descriptivos (tabla III.105.) los valores medios que se obtienen para la concentración de hidroperóxidos en membrana de eritrocito basales (nmol/mg) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.16.-** Concentración de hidropéroxidos en membrana de eritrocitos basales (nmol/mg). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.106.). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.106.) en el grupo placebo ( $p=0,02$  y  $p=0,01$ ), grupo melatonina ( $p=0,00$ ), grupo coenzima ( $p=0,00$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,01$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que sí existen diferencias significativas para la concentración de hidropéroxidos en membrana de eritrocito basales en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.107.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianza ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico son de  $p=0,698$  y  $p=0,478$ , siendo mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, se asume la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro

grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

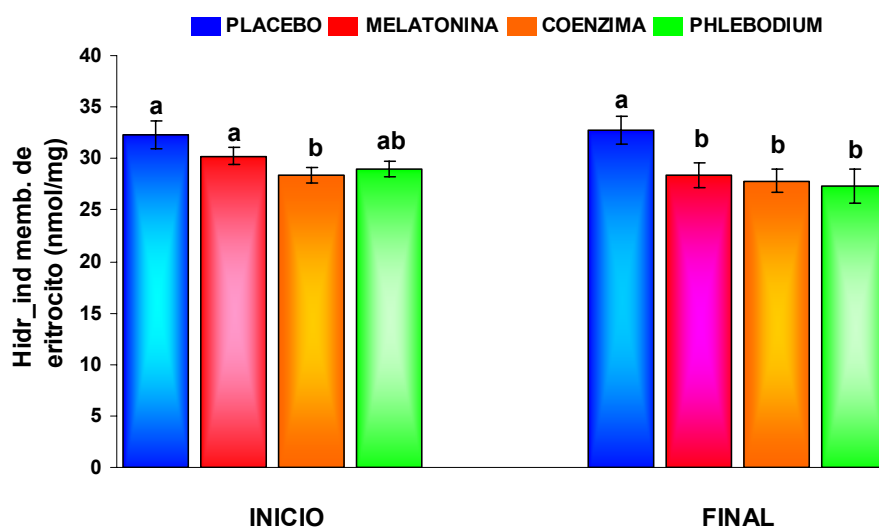
En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.108.) el nivel de significación obtenido  $p=0,365$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de hidroperóxidos de membrana de eritrocito basales (nmol/mg) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

En la prueba ANOVA para el final del ejercicio físico (tabla III.109.) el nivel de significación obtenido  $p=0,219$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de hidroperóxidos de membrana de eritrocito basales (nmol/mg) entre los distintos grupos al final del ejercicio.

#### 1.4.5. Hidroperóxidos en membrana de eritrocito inducidos con AAPH:

En la tabla de descriptivos (tabla III.110.) los valores medios que se obtienen para la concentración de hidroperóxidos en membrana de eritrocito inducidos con AAPH (nmol/mg) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.17.-** Concentración de hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del

ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias significativas entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p < 0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p < 0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.111.). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.111.) en el grupo placebo ( $p=0,81$ ), grupo melatonina ( $p=0,22$ ), grupo coenzima ( $p=0,66$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,37$  y  $p=0,40$ ) son mayores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas para la concentración de hidroperóxidos en membrana de eritrocito inducidos con AAPH entre ambos periodos de tiempo, para cada uno de los grupos.

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de varianzas (tabla III.112.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico son de  $p=0,602$  y  $p=0,497$ , siendo mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, se asume la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA al inicio del ejercicio físico (tabla III.113.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,035$ , es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de hidroxiperóxidos en membrana inducidos con AAPH entre los distintos grupos al inicio del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En la prueba DMS (tabla III.114.), los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo coenzima ( $p=0,007$ ) y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,017$ ) son menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ ,

lo que nos indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto a los grupos coenzima y *Phlebodium* al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

Además, observando las comparaciones múltiples en dicha tabla III.114, se constata que no existen diferencias significativas entre el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,145$ , al ser valores superiores a  $\alpha=0,05$ . No existen diferencias significativas entre los grupos coenzima y *Phlebodium* ( $p=0,682$ ) al inicio del ejercicio físico.

Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.115.), en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,313$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,018$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,043$ , lo que nos indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo placebo y los grupos coenzima y *Phlebodium* al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.116.), el nivel de significación obtenido  $p=0,023$  es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de hidroxiperóxidos en membrana inducidos con AAPH entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc. Hemos elegido la prueba DMS y la t de Dunnett.

En la prueba DMS (tabla III.117.), los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,026$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,011$ ), y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,007$ ) han sido menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto al resto de los tres grupos al final del ejercicio (después de la carrera). No existen diferencias significativas entre los restantes grupos entre sí al ser sus niveles de significación

mayores que  $\alpha=0,05$ .

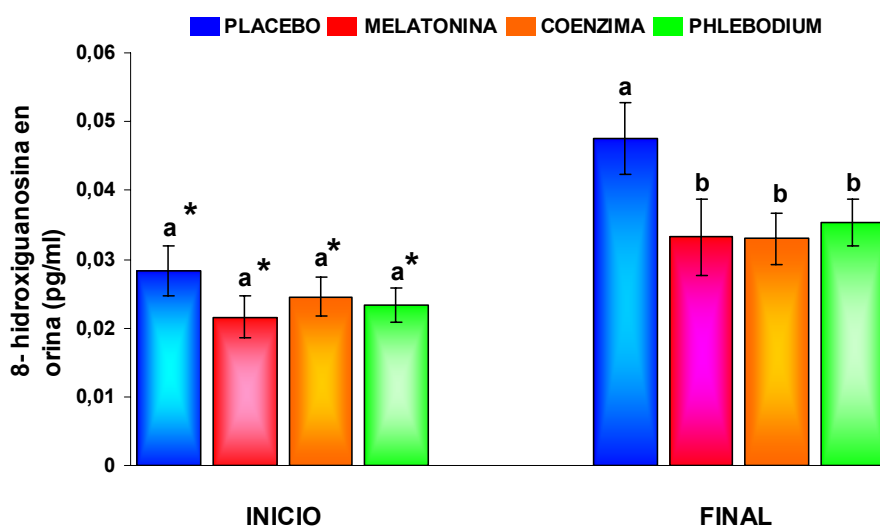
Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.118.), en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,057$ ), con respecto al grupo coenzima ( $p=0,029$ ), y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,019$ ), lo que nos indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo placebo con respecto a los otros grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

## 2. VARIABLES EN ORINA.

### 2.1. 8-Hidroxi guanosina en orina:

En la tabla de descriptivos (tabla III.119.) los valores medios que se obtienen para la concentración de 8-hidroxi guanosina en orina (pg/ml) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.18.-** Concentración de 8-hidroxi guanosina en orina (pg/ml). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p<0.05$ ). \* Indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p<0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre

ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.120). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.) en el grupo placebo ( $p=0,00$  y  $p=0,01$ ), grupo melatonina ( $p=0,04$ ), grupo coenzima ( $p=0,03$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,01$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que sí existen diferencias significativas para la concentración de 8-hidroxiguanosina en orina en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.121.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico ( $p=0,585$  y  $p=0,582$ , respectivamente) son ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.122.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,455$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de 8-hidroxiguanosina en orina entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

En la prueba ANOVA para el final del ejercicio físico (tabla III.123.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,098$  es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de 8-hidroxiguanosina en orina entre los distintos grupos al final del ejercicio. Al ser un nivel de significación sólo ligeramente superior a  $p=0,05$  realizamos una prueba DMS.

En la prueba DMS (tabla III.124.), los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina ( $p=0,035$ ), con respecto al grupo

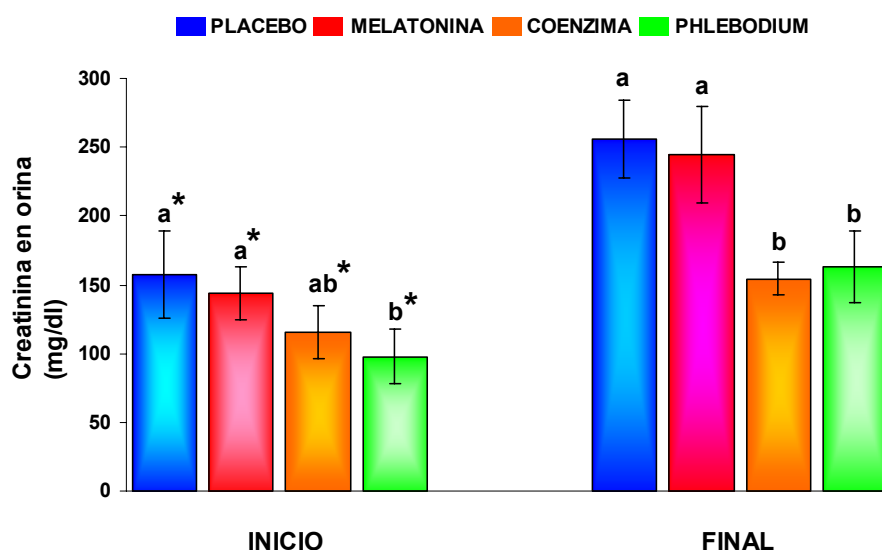


coenzima ( $p=0,032$ ), y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,049$ ) son menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo con respecto al resto de los tres grupos al final del ejercicio (después de la carrera). No existen diferencias significativas entre los restantes grupos entre sí al ser sus niveles de significación mayores que  $\alpha=0,05$ .

## 2.2. Creatinina:

En la tabla de descriptivos (tabla III.125.) los valores medios que se obtienen para la concentración de creatinina en orina (mg/dl) difieren:

- entre los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo, antes de comenzar el ejercicio físico (inicio) y después del ejercicio físico (final).
- en un mismo grupo entre ambos periodos de tiempo, (inicio y final), como podemos observar en el siguiente gráfico:



**Gráfico III.19.-** Concentración de creatinina en orina (mg/dl). Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de cada grupo (N=8) al inicio y al final del ejercicio. La aparición de letras no coincidentes indica existencia de diferencias entre los grupos para cada periodo de tiempo ( $p<0.05$ ). \* indica existencia de diferencias significativas para un mismo grupo entre los dos periodos de tiempos ( $p<0.05$ ).

Para ver si las diferencias entre los distintos valores medios para cada grupo entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico) son estadísticamente significativas aplicamos una prueba T de Student (tabla III.126.). Los niveles de significación obtenidos (tabla III.) en el grupo placebo ( $p=0,04$ ), grupo melatonina

( $p=0,02$  y  $p=0,03$ ), grupo coenzima ( $p=0,01$ ) y grupo *Phlebodium* ( $p=0,04$ ) son menores que el nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis alternativa de que sí existen diferencias significativas para la concentración de creatinina en orina cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo (inicio y final del ejercicio físico).

Observamos que existen diferencias entre los valores medios de los distintos grupos para un mismo periodo de tiempo (inicio o final del ejercicio físico), veamos si son estadísticamente significativas. Para ello, aplicamos primeramente la prueba de homogeneidad de la varianzas (tabla III.127.). Se verifica la hipótesis de homogeneidad de varianzas ya que los niveles de significación obtenidos en la prueba de Levene al inicio y final del ejercicio físico son de  $p=0,840$  y  $p=0,191$ , siendo ambos mayores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ . Por tanto, podemos asumir la igualdad de varianzas y aplicamos una prueba ANOVA. Realizamos el estudio de la comparación de los cuatro grupos separadamente al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

En la prueba ANOVA para el inicio del ejercicio físico (tabla III.128.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,261$ , es mayor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos aceptar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos para los valores de creatinina en orina (mg/dl) entre los distintos grupos al inicio del ejercicio.

En la prueba ANOVA al final del ejercicio físico (tabla III.129.), el nivel de significación obtenido  $p= 0,024$ , es menor que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que indica que debemos rechazar la hipótesis nula de la no existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos. Por tanto, sí existen diferencias significativas para los valores de creatinina en orina (mg/dl) entre los distintos grupos al final del ejercicio. Ahora bien, para conocer a qué son debidas esas diferencias entre los grupos y en qué grupos se constatan esas diferencias aplicamos las pruebas post hoc.

En la prueba DMS (tabla III.130.), los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo coenzima ( $p=0,019$ ) y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,030$ ) son menores que el nivel mínimo de significación fijado  $\alpha=0,05$ , lo que nos indica que debemos rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas, y que por tanto sí existen diferencias estadísticamente significativas entre

el grupo placebo con respecto a los grupos coenzima y *Phlebodium* al final del ejercicio (después de la carrera).

Además, observando las comparaciones múltiples en dicha tabla III.130, se constatan diferencias significativas entre el grupo melatonina con respecto al grupo coenzima ( $p=0,022$ ) y con respecto al grupo *Phlebodium* ( $p=0,036$ ) al ser valores inferiores a  $\alpha=0,05$ . No existen diferencias significativas entre los grupos placebo y melatonina ( $p=0,777$ ), así como tampoco entre los grupos coenzima y *Phlebodium* ( $p=0,813$ ) al final del ejercicio físico.

Similares resultados obtenemos en la prueba t de Dunnett (tabla III.131.) en la que los niveles de significación obtenidos para el grupo placebo con respecto al grupo melatonina  $p=0,981$ , con respecto al grupo coenzima  $p=0,046$ , y con respecto al grupo *Phlebodium*  $p=0,027$ , lo que nos indica la existencia de diferencias significativas entre el grupo placebo y los grupos coenzima y *Phlebodium* al final del ejercicio (después de la carrera.).

**TABLAS DE RESULTADOS.****Tabla III.1. Descriptivos.** Valores de Bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ) al inicio (antes) y final (después) del ejercicio físico.

Bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ).	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	32,031	30,932	37,009	39,436	21,863	26,749	36,551	30,673	32,703	26,871
Error típico	1,979	1,714	3,341	3,452	2,712	2,648	2,871	2,946	4,623	3,039
Desv. típ.	11,199	9,696	9,451	9,763	7,672	7,491	8,120	8,332	13,076	8,596
Varianza	125,435	94,022	89,334	95,333	58,870	56,125	65,949	69,434	171,008	73,908
Mínimo	11,115	11,115	17,100	27,360	11,115	11,115	18,810	13,680	16,245	17,100
Mediana	35,910	29,497	37,314	37,192	21,191	26,627	37,620	33,345	34,200	27,543
Máximo	53,865	52,155	48,735	52,155	37,620	37,620	47,025	40,185	53,865	44,460
Rango	42,750	41,040	31,635	24,795	26,505	26,505	28,215	26,505	37,620	27,360
Asimetría	-,143	,295	-1,304	,244	1,090	-1,108	-1,540	-1,271	,251	1,116
Curtosis	-1,039	,291	2,822	-1,872	2,598	3,164	3,899	1,797	-,971	2,108

**Tabla III.2. Prueba T de Student** para los valores medios de bilirrubina plasmática ( $\mu\text{mol/l}$ ) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final de ejercicio físico.

Bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ )	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	2,722	,104	,420	62	,676
(b)			,420	60,755	,676
<b>Placebo</b>					
(a)	,551	,470	-,505	14	,621
(b)			-,505	13,985	,621
<b>Melatonina</b>					
(a)	,026	,873	-1,289	14	,218
(b)			-1,289	13,992	,218
<b>Coenzima Q</b>					
(a)	,226	,642	1,429	14	,175
(b)			1,429	13,991	,175
<b>Phlebodium</b>					
(a)	2,498	,136	1,054	14	,310
(b)			1,054	12,098	,312

(a)= Se han asumido varianzas iguales.(b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.3. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Bilirrubina	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	1,521	3	28	,231
Después	,706	3	28	,557

**Tabla III.4. ANOVA. Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).**

Bilirrubina. ( $\mu\text{mol/l}$ )	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1192,361	3	397,454	4,128	,015
Intra-grupos	2696,125	28	96,290		
Total	3888,486	31			

**Tabla III.5. DMS. Comparaciones múltiples de una variable dependiente (bilirrubina) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).**

Bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ )	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>DMS</b>	Placebo	Melatonina	15,145714*	4,906378	,005
		Coenzima	,458036	4,906378	,926
		Phlebodium	4,305536	4,906378	,388
	Melatonina	Placebo	-15,145714*	4,906378	,005
		Coenzima	-14,687679*	4,906378	,006
		Phlebodium	-10,840179*	4,906378	,035
	Coenzima	Placebo	-,458036	4,906378	,926
		Melatonina	14,687679*	4,906378	,006
		Phlebodium	3,847500	4,906378	,440
	Phlebodium	Placebo	-4,305536	4,906378	,388
		Melatonina	10,840179*	4,906378	,035
		Coenzima	-3,847500	4,906378	,440

**Tabla III.6. t de Dunnett. Comparaciones múltiples de una variable dependiente (bilirrubina) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).**

Bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ).	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	-15,145714*	4,906378	,012
	Coenzima	Placebo	-,458036	4,906378	,999
	Phlebodium	Placebo	-4,305536	4,906378	,713

**Tabla III.7. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Bilirrubina (µmol/l).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	851,066	3	283,689	3,849	,020
Intra-grupos	2063,605	28	73,700		
Total	2914,671				

**Tabla III.8. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (bilirrubina) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Bilirrubina (µmol/l).</b>  <b>DMS</b>	Placebo	Melatonina	12,687589*	4,292441	,006
		Coenzima	8,763750	4,292441	,051
		Phlebodium	12,565446*	4,292441	,007
	Melatonina	Placebo	-12,687589*	4,292441	,006
		Coenzima	-3,923839	4,292441	,368
		Phlebodium	-,122143	4,292441	,978
	Coenzima	Placebo	-8,763750	4,292441	,051
		Melatonina	3,923839	4,292441	,368
		Phlebodium	3,801696	4,292441	,383
	Phlebodium	Placebo	-12,565446*	4,292441	,007
		Melatonina	,122143	4,292441	,978
		Coenzima	-3,801696	4,292441	,383

**Tabla III.9. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (bilirrubina) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Bilirrubina (µmol/l).</b>	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	-12,687589*	4,292441	,017
	Coenzima	Placebo	-8,763750	4,292441	,049
	Phlebodium	Placebo	-12,565446*	4,292441	,018

**Tabla III.10. Descriptivos.** Valores de Colesterol total en plasma (mmol/l) al inicio (antes) y final (después) del ejercicio físico.

Colesterol total (mmol/l)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	4,384	4,455	4,449	4,605	4,032	3,461	4,549	4,664	4,506	5,092
Error típico	,103	,160	,167	,244	,144	,198	,236	,297	,242	,261
Desv. típ.	,582	,905	,474	,690	,408	,562	,669	,790	,685	,739
Varianza	,340	,821	,225	,477	,167	,317	,448	,625	,470	,547
Mínimo	3,532	2,600	4,031	3,886	3,584	2,600	3,532	3,965	3,571	4,057
Mediana	4,306	4,194	4,391	4,398	3,906	3,334	4,785	4,194	4,588	5,225
Máximo	5,462	6,053	5,462	5,908	4,661	4,517	5,396	6,000	5,304	6,053
Rango	1,930	3,453	1,431	2,022	1,077	1,917	1,864	2,035	1,733	1,996
Asimetría	,302	,159	1,538	,986	,830	,648	-,418	,860	-,177	-,157
Curtosis	-1,15	-,674	2,740	,295	-,723	1,411	-1,46	-1,142	-2,073	-1,464

**Tabla III.11. Prueba T de Student** para los valores medios de colesterol total plasmático (mmol/l) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Colesterol (mmol/l)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>	5,481	,022	-,375	62	,709
			-,375	52,913	,709
<b>Placebo</b>	1,508	,240	-,526	14	,607
			-,526	12,406	,608
<b>Melatonina</b>	,232	,638	2,324	14	,036
			2,324	12,773	,037
<b>Coenzima</b>	,756	,399	-,314	14	,758
			-,314	13,629	,759
<b>Phlebodium</b>	,001	,976	-1,643	14	,123
			-1,643	13,920	,123

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.12. Prueba de homogeneidad** o igualdad de varianzas.

<b>Colesterol total</b>	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	2,641	3	28	,069
Después	1,006	3	28	,405

**Tabla III.13. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias de colesterol total en plasma (mmol/l) entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

<b>Colesterol total (mmol/l).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,362	3	,454	1,386	,267
Intra-grupos	9,172	28	,328		
Total	10,535	31			

**Tabla III.14. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias de colesterol total en plasma (mmol/l) entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Colesterol total (mmol/l)</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	11,684	3	3,895	7,924	,001
Intra-grupos	13,762	28	,491		
Total	25,445	31			

**Tabla III.15. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable (colesterol total plasmático) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Colesterol total (mmol/l).</b>  <b>DMS</b>	Placebo	Melatonina	1,143931*	,350530	,003
		Coenzima	-,059084	,350530	,867
		Phlebodium	-,487443	,350530	,175
	Melatonina	Placebo	-1,143931*	,350530	,003
		Coenzima	-1,203015*	,350530	,002
		Phlebodium	-1,631374*	,350530	,000
	Coenzima	Placebo	,059084	,350530	,867
		Melatonina	1,203015*	,350530	,002
		Phlebodium	-,428359	,350530	,232
	Phlebodium	Placebo	,487443	,350530	,175
		Melatonina	1,631374*	,350530	,000
		Coenzima	,428359	,350530	,232

**Tabla III.16. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (colesterol total plasmático) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Colesterol total (mmol/l).</b>	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup>.</b>	Melatonina	Placebo	-1,143931*	,350530	,008
	Coenzima	Placebo	,059084	,350530	,997
	Phlebodium	Placebo	,487443	,350530	,382



**Tabla III.17. Descriptivos.** Valores de Fosfolípidos en plasma (mmol/l) al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

Fosfolípidos (mmol/l)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	2,301	2,038	2,311	2,016	2,078	1,874	2,449	2,190	2,364	2,072
Error típico	,054	,049	,076	,126	,134	,088	,121	,072	,061	,085
Desv. típ.	,310	,281	,217	,358	,381	,249	,344	,204	,175	,242
Varianza	,097	,079	,047	,129	,145	,062	,118	,042	,031	,059
Mínimo	1,451	1,592	2,029	1,592	1,451	1,592	1,873	1,873	2,044	1,685
Mediana	2,356	2,075	2,325	1,958	2,130	1,849	2,543	2,270	2,387	2,101
Máximo	2,887	2,497	2,668	2,497	2,590	2,278	2,887	2,403	2,653	2,419
Rango	1,436	,905	,640	,905	1,139	,687	1,014	,531	,609	,733
Asimetría	-,605	-,109	,306	,207	-,420	,423	-,458	-,951	-,320	-,107
Curtosis	,751	-1,306	-,808	-1,988	-,653	-1,191	-,618	-,586	1,521	-,512

**Tabla III.18. Prueba T de Student** para los valores medios de fosfolípidos plasmáticos para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Fosfolípidos (mmol/l)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>			3,544	62	,001
(b)			3,544	61,387	,001
<b>Placebo</b>			1,986	14	,067
(b)			1,986	11,524	,071
<b>Melatonina</b>			1,271	14	,225
(b)			1,271	12,058	,228
<b>Coenzima</b>			1,834	14	,088
(b)			1,834	11,382	,093
<b>Phlebodium</b>			2,762	14	,015
(b)			2,762	12,745	,016

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.19. Prueba de homogeneidad** o igualdad de varianzas.

Fosfolípidos	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	2,282	3	28	,101
Después	2,147	3	28	,117

**Tabla III.20. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Fosfolípidos. (mmol/l).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,605	3	,202	2,363	,093
Intra-grupos	2,391	28	,085		
Total	2,996	31			

**Tabla III.21. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable (fosfolípidos) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Fosfolípidos (mmol/l).</b>	Placebo	Melatonina	,232679	,146115	,123
		Coenzima	-,138493	,146115	,351
		Phlebodium	-,052666	,146115	,721
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	-,232679	,146115	,123
		Coenzima	-,371172*	,146115	,017
		Phlebodium	-,285346	,146115	,061
<b>DMS</b>	Coenzima	Placebo	,138493	,146115	,351
		Melatonina	,371172*	,146115	,017
		Phlebodium	,085827	,146115	,562
<b>DMS</b>	Phlebodium	Placebo	,052666	,146115	,721
		Melatonina	,285346	,146115	,061
		Coenzima	-,085827	,146115	,562

**Tabla III.22. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable (fosfolípidos) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Fosfolípidos (mmol/l).</b>	Placebo	Melatonina	,142673	,134914	,299
		Coenzima	-,173604	,134914	,209
		Phlebodium	-,055174	,134914	,686
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	-,142673	,134914	,299
		Coenzima	-,316277*	,134914	,026
		Phlebodium	-,197847	,134914	,154
<b>DMS</b>	Coenzima	Placebo	,173604	,134914	,209
		Melatonina	,316277*	,134914	,026
		Phlebodium	,118430	,134914	,388
<b>DMS</b>	Phlebodium	Placebo	,055174	,134914	,686
		Melatonina	,197847	,134914	,154
		Coenzima	-,118430	,134914	,388

**Tabla III.23. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Fosfolípidos (mmol/l).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,413	3	,138	1,893	,154
Intra-grupos	2,309	28	,073		
Total	2,452	31			

**Tabla III.24. Descriptivos.** Valores de Triglicéridos en plasma (mmol/l) antes y después del ejercicio.

<b>Triglicéridos (mmol/l)</b>	<b>Global</b>		<b>Placebo</b>		<b>Melatonina</b>		<b>Coenzima</b>		<b>Phlebodium</b>	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	1,775	1,616	1,714	1,306	1,778	1,766	1,909	1,749	1,699	1,644
Error típico	,058	,053	,091	,088	,122	,123	,143	,073	,110	,058
Desv. típ.	,329	,305	,259	,250	,346	,350	,404	,209	,312	,165
Varianza	,108	,093	,067	,063	,120	,123	,164	,044	,098	,028
Mínimo	1,255	,893	1,343	,893	1,488	1,255	1,287	1,448	1,255	1,416
Mediana	1,753	1,642	1,757	1,302	1,672	1,829	2,038	1,733	1,664	1,650
Máximo	2,340	2,204	2,059	1,697	2,332	2,204	2,340	2,131	2,051	1,882
Rango	1,086	1,311	,716	,804	,844	,949	1,054	,684	,796	,466
Asimetría	,201	-,147	-,235	-,108	1,026	-,263	-,573	,521	-,217	-,069
Curtosis	-1,105	-,104	-1,482	,119	-,615	-1,576	-1,463	,643	-1,447	-1,169

**Tabla III.25. Prueba T de Student** para los valores medios de triglicéridos en plasma (mmol/l) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Triglicéridos (mmol/l)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	,599	,442	1,997	62	,050
(b)			1,997	61,648	,050
<b>Placebo</b>					
(a)	,226	,642	3,194	14	,007
(b)			3,194	13,982	,007
<b>Melatonina</b>					
(a)	,071	,793	,070	14	,945
(b)			,070	13,998	,945
<b>Coenzima</b>					
(a)	5,717	,031	,992	14	,338
(b)			,992	10,490	,344
<b>Phlebodium</b>					
(a)	3,122	,099	,438	14	,668
(b)			,438	10,653	,670

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.26. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Triglicéridos	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,796	3	28	,506
Después	2,045	3	28	,130

**Tabla III.27. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Triglicéridos (mmol/l).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,220	3	,073	,653	,588
Intra-grupos	3,143	28	,112		
Total	3,363	31			

**Tabla III.28. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Triglicéridos (mmol/l).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,094	3	,365	5,679	,004
Intra-grupos	1,797	28	,064		
Total	2,891	31			

**Tabla III.29. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (triglicéridos) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Triglicéridos (mmol/l).</b>	Placebo	Melatonina	-,459440*	,126669	,001
		Coenzima	-,442349*	,126669	,002
		Phlebodium	-,337219*	,126669	,013
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	,459440*	,126669	,001
		Coenzima	,017091	,126669	,894
		Phlebodium	,122220	,126669	,343
<b>DMS</b>	Coenzima	Placebo	,442349*	,126669	,002
		Melatonina	-,017091	,126669	,894
		Phlebodium	,105130	,126669	,414
<b>DMS</b>	Phlebodium	Placebo	,337219*	,126669	,013
		Melatonina	-,122220	,126669	,343
		Coenzima	-,105130	,126669	,414

**Tabla III.30. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (triglicéridos) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Triglicéridos (mmol/l).	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	,459440*	,126669	,003
	Coenzima	Placebo	,442349*	,126669	,004
	Phlebodium	Placebo	,337219*	,126669	,034

**Tabla III.31. Descriptivos.** Valores de Proteínas en plasma (mg/ml) al inicio (antes) y al final (después) del ejercicio físico.

Pro_plas (mg/ml)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	68,726	67,990	73,306	68,367	68,391	66,713	66,542	66,932	66,664	69,949
Error típico	1,185	1,352	1,980	1,468	2,141	3,165	2,030	1,437	2,820	4,144
Desv. típ.	6,704	7,648	5,600	4,153	6,056	8,953	5,742	4,065	7,976	11,723
Varianza	44,952	58,502	31,370	17,254	36,682	80,172	32,980	16,526	63,632	137,437
Mínimo	54,815	48,976	66,883	62,991	59,876	54,426	54,815	60,071	55,789	48,976
Mediana	68,440	67,564	71,652	67,369	69,803	65,618	66,591	67,175	67,856	71,068
Máximo	82,066	88,294	81,482	74,669	76,032	81,482	75,448	72,333	82,066	88,294
Rango	27,250	39,318	14,598	11,679	16,155	27,055	20,632	12,263	26,277	39,318
Asimetría	,027	,113	,493	,534	-,282	,337	-,877	-,347	,704	-,377
Curtosis	,021	1,271	-1,533	-,785	-1,739	-,720	3,081	-,445	1,383	,858

**Tabla III.32. Prueba T de Student** para los valores medios de proteínas plasmáticas (mg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Pro_plas (mg/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>	,297	,587	,409	62	,684
			,409	60,954	,684
<b>Placebo</b>	1,375	,261	2,003	14	,065
			2,003	12,912	,067
<b>Melatonina</b>	1,670	,217	,439	14	,667
			,439	12,297	,668
<b>Coenzima</b>	,028	,870	-,156	14	,878
			-,156	12,607	,878
<b>Phlebodium</b>	,891	,361	-,655	14	,523
			-,655	12,338	,524

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.33. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Pro_plas	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,449	3	28	,720
Después	3,113	3	28	,042

**Tabla III.34. ANOVA. Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).**

Proteínas (mg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	240,883	3	80,294	1,951	,144
Intra-grupos	1152,641	28	41,166		
Total	1393,524	31			

**Tabla III.35. DMS. Comparaciones múltiples de una variable (proteínas plasmáticas) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).**

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Prot_plas (mg/ml).</b>	Placebo	Melatonina	4,914746	3,208027	,137
		Coenzima	6,763859	3,208027	,044
		Phlebodium	6,642206	3,208027	,048
	Melatonina	Placebo	-4,914746	3,208027	,137
		Coenzima	1,849112	3,208027	,569
		Phlebodium	1,727460	3,208027	,595
	Coenzima	Placebo	-6,763859*	3,208027	,044
		Melatonina	-1,849112	3,208027	,569
		Phlebodium	-,121652	3,208027	,970
	Phlebodium	Placebo	-6,642206*	3,208027	,048
		Melatonina	-1,727460	3,208027	,595
		Coenzima	,121652	3,208027	,970

**Tabla III.36. Welch. Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio (después de la carrera), pero sin asumir igualdad de varianzas entre los grupos.**

Proteínas (mg/ml)	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	,270	3	14,716	,846
Brown-Forsythe	,286	3	17,089	,835

a. Distribuidos en F asintóticamente.

**Tabla III.37. Descriptivos.** Valores de Interleukina-6 en plasma (pg/ml) antes y después del ejercicio.

Interleukina6 (pg/ml)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	3,837	43,530	5,108	39,635	3,340	52,403	3,473	40,856	3,428	41,228
Error típico	,374	3,418	,728	7,991	,711	7,024	,799	5,638	,704	6,842
Desv. típ.	2,116	19,338	2,060	22,604	2,012	19,868	2,261	15,948	1,991	19,352
Varianza	4,481	373,979	4,246	510,973	4,050	394,766	5,113	254,363	3,965	374,535
Mínimo	,450	20,140	2,220	20,140	,450	32,710	1,120	21,950	1,120	20,610
Mediana	3,840	38,500	4,605	33,595	3,135	45,950	2,870	36,895	3,385	39,085
Máximo	8,520	89,800	8,520	89,800	6,510	79,010	6,670	65,420	7,270	83,700
Rango	8,070	69,660	6,300	69,660	6,060	46,300	5,550	43,470	6,150	63,090
Asimetría	,395	,984	,563	1,870	,300	,380	,338	,467	,900	1,669
Curtosis	-,654	,041	-,253	3,775	-,460	-2,125	-2,045	-1,340	,911	3,664

**Tabla III.38. Prueba T de Student** para los valores medios de interleukina-6 (pg/ml) en plasma para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

IL-6 (pg/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>	47,075	,000	-11,542	62	,000
			-11,542	31,743	,000
<b>Placebo</b>	6,736	,021	-4,302	14	,001
			-4,302	7,116	,003
<b>Melatonina</b>	31,233	,000	-6,949	14	,000
			-6,949	7,144	,000
<b>Coenzima</b>	18,645	,001	-6,564	14	,000
			-6,564	7,281	,000
<b>Phlebodium</b>	4,913	,044	-5,495	14	,000
			-5,495	7,148	,001

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.



**Tabla III.39. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Interleukina-6	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,346	3	28	,792
Después	,265	3	28	,850

**Tabla III.40. ANOVA. Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).**

Interleukina-6 (pg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17,304	3	5,768	1,328	,285
Intra-grupos	121,620	28	4,344		
Total	138,924	31			

**Tabla III.41. ANOVA. Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio (después de la carrera).**

Interleukina-6 (pg/ml)	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	850,873	3	283,624	,739	,538
Intra-grupos	10742,461	28	383,659		
Total	11593,334	31			

**Tabla III.42. Descriptivos. Valores de TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) antes y después del ejercicio.**

TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	16,668	20,502	21,925	28,160	14,732	16,730	16,979	21,857	13,035	15,261
Error típico	,974	1,175	1,699	1,764	1,495	1,782	1,357	1,697	1,863	,853
Desv. típ.	5,512	6,651	4,806	4,989	4,229	5,042	3,838	4,800	5,271	2,414
Varianza	30,389	44,249	23,101	24,895	17,890	25,428	14,736	23,042	27,788	5,829
Mínimo	6,485	11,821	16,380	22,099	7,940	11,911	10,455	15,217	6,485	11,821
Mediana	16,769	18,857	21,630	29,074	14,490	14,491	18,039	21,767	12,549	16,121
Máximo	28,138	35,505	28,138	35,505	21,039	25,228	21,524	30,059	24,440	17,643
Rango	21,653	23,684	11,758	13,406	13,099	13,317	11,069	14,842	17,955	5,822
Asimetría	,312	,578	,121	-,006	-,097	1,009	-,607	,469	1,493	-,471
Curtosis	-,451	-,634	-2,162	-1,534	-,481	-,600	-,827	-,066	3,521	-1,929

**Tabla III.43. Prueba T de Student** para los valores medios de TNF- $\alpha$  (pg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

TNF- $\alpha$ (pg/ml).	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b> (a)	1,814	,183	-2,511	62	,015
			(b)	-2,511	59,933
<b>Placebo</b> (a)	,018	,895	-2,545	14	,023
			(b)	-2,545	13,980
<b>Melatonina</b> (a)	,413	,531	-,859	14	,405
			(b)	-,859	13,588
<b>Coenzima</b> (a)	,052	,822	-2,245	14	,041
			(b)	-2,245	13,354
<b>Phlebodium</b> (a)	,776	,393	-1,086	14	,296
			(b)	-1,086	9,813

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.44. Prueba de homogeneidad** o igualdad de varianzas.

TNF- $\alpha$	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,326	3	28	,807
Después	1,405	3	28	,262

**Tabla III.45. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos antes de la carrera.

TNF- $\alpha$ (pg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	357,467	3	119,156	5,707	,004
Intra-grupos	584,607	28	20,879		
Total	942,074	31			

**Tabla III.46. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (TNF-  $\alpha$  en plasma) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>TNF- <math>\alpha</math> (pg/ml).</b>	Placebo	Melatonina	7,193250*	2,284666	,004
		Coenzima	4,945750*	2,284666	,039
		Phlebodium	8,890375*	2,284666	,001
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	-7,193250*	2,284666	,004
		Coenzima	-2,247500	2,284666	,334
		Phlebodium	1,697125	2,284666	,464
	Coenzima	Placebo	-4,945750*	2,284666	,039
		Melatonina	2,247500	2,284666	,334
		Phlebodium	3,944625	2,284666	,095
	Phlebodium	Placebo	-8,890375*	2,284666	,001
		Melatonina	-1,697125	2,284666	,464
		Coenzima	-3,944625	2,284666	,095

**Tabla III.47. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos después de la carrera.

<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	817,361	3	272,454	13,761	,000
Intra-grupos	554,360	28	19,799		
Total	1371,720	31			

**Tabla III.48. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (TNF- $\alpha$  en plasma) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml).</b>	Placebo	Melatonina	11,429500*	2,224779	,000
		Coenzima	6,302250*	2,224779	,008
		Phlebodium	12,898500*	2,224779	,000
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	-11,429500*	2,224779	,000
		Coenzima	-5,127250*	2,224779	,029
		Phlebodium	1,469000	2,224779	,514
	Coenzima	Placebo	-6,302250*	2,224779	,008
		Melatonina	5,127250*	2,224779	,029
		Phlebodium	6,596250*	2,224779	,006
	Phlebodium	Placebo	-12,898500*	2,224779	,000
		Melatonina	-1,469000	2,224779	,514
		Coenzima	-6,596250*	2,224779	,006

**Tabla III.49. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (TNF- $\alpha$  en plasma) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

TNF- $\alpha$ (pg/ml).	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	-11,429500*	2,224779	,000
	Coenzima	Placebo	-6,302250*	2,224779	,023
	Phlebodium	Placebo	-12,898500*	2,224779	,000

**Tabla III.50. Descriptivos.** Valores de receptor antagonista de Interleukina-1 en plasma (pg/ml) antes y después del ejercicio.

Il-1 <sub>ra</sub> (pg/ml)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	36,367	405,884	37,987	364,73	36,054	542,84	33,747	318,34	37,679	397,62
Error típico	2,097	27,421	4,2313	47,274	5,053	58,760	4,566	47,503	3,470	36,743
Desv. tip.	11,867	155,121	11,967	133,712	14,293	166,19	12,916	134,359	9,815	103,927
Varianza	140,828	24062,6	143,233	1787,91	204,317	27621,9	166,842	18052,60	96,351	10800,96
Mínimo	18,890	106,440	23,529	106,440	21,984	336,310	18,890	189,440	19,924	267,620
Mediana	36,660	405,105	35,907	386,471	31,701	518,360	33,569	301,425	40,264	381,158
Máximo	68,414	756,740	59,062	549,790	68,414	756,740	52,882	564,200	47,732	548,660
Rango	49,524	650,300	35,533	443,350	46,430	420,430	33,992	374,760	27,808	281,040
Asimetría	,603	,452	,617	-,888	1,956	,190	,187	,771	-1,067	,387
Curtosis	,319	,140	-,346	1,337	4,501	-1,956	-1,605	-,200	,075	-1,283

**Tabla III.51. Prueba T de Student** para los valores medios de IL-1<sub>ra</sub> (pg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

IL-1 <sub>ra</sub> (pg/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	34,536	,000	-13,436	62	,000
(b)			-13,436	31,363	,000
<b>Placebo</b>					
(a)	7,324	,017	-6,884	14	,000
(b)			-6,884	7,112	,000
<b>Melatonina</b>					
(a)	50,420	,000	-8,593	14	,000
(b)			-8,593	7,104	,000
<b>Coenzima</b>					
(a)	21,688	,000	-5,964	14	,000
(b)			-5,964	7,129	,001
<b>Phlebodium</b>					
(a)	20,462	,000	-9,753	14	,000
(b)			-9,753	7,125	,000

(a)= Se han asumido varianzas iguales.(b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.52. Prueba de homogeneidad** o igualdad de varianzas.

IL-1 <sub>ra</sub>	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,301	3	28	,824
Después	1,408	3	28	,261

**Tabla III.53. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

IL-1 <sub>ra</sub> (pg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	90,476	3	30,159	,198	,897
Intra-grupos	4275,202	28	152,686		
Total	4365,678	31			

**Tabla III.54. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio (después de la carrera).

<b>IL_1 ra (pg/ml).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	225461,440	3	75153,813	4,043	,017
Intra-grupos	520481,093	28	18588,610		
Total	745942,533	31			

**Tabla III.55. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (receptor antagonista de la IL-1 en plasma) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>IL-1 ra (pg/ml).</b>	Placebo	Melatonina	-178,108393*	68,170027	,014
		Coenzima	46,391607	68,170027	,502
		Phlebodium	-32,890268	68,170027	,633
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	178,108393*	68,170027	,014
		Coenzima	224,500000*	68,170027	,003
		Phlebodium	145,218125*	68,170027	,042
<b>DMS</b>	Coenzima	Placebo	-46,391607	68,170027	,502
		Melatonina	-224,500000*	68,170027	,003
		Phlebodium	-79,281875	68,170027	,255
<b>DMS</b>	Phlebodium	Placebo	32,890268	68,170027	,633
		Melatonina	-145,218125*	68,170027	,042
		Coenzima	79,281875	68,170027	,255

**Tabla III.56. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (receptor antagonista de la IL\_1 en plasma) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>IL-1 ra (pg/ml).</b>	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	178,108393*	68,170027	,037
	Coenzima	Placebo	-46,391607	68,170027	,836
	Phlebodium	Placebo	32,890268	68,170027	,931

**Tabla III.57. Descriptivos.** Valores del receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (ng/ml) antes y después del ejercicio.

sTNF- $\alpha$ _rII	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	4,717	5,385	3,654	4,148	4,985	6,100	5,306	5,074	4,923	6,219
Error típico	,202	,205	,381	,205	,168	,291	,533	,376	,206	,273
Desv. típ.	1,147	1,162	1,077	,580	,477	,824	1,508	1,063	,583	,773
Varianza	1,316	1,351	1,162	,337	,228	,679	2,277	1,132	,341	,599
Mínimo	2,100	3,416	2,100	3,416	4,320	5,051	3,540	3,736	4,281	5,147
Mediana	4,714	5,367	3,777	4,137	5,032	6,079	4,906	4,902	4,730	6,204
Máximo	7,647	7,186	5,211	4,955	5,564	7,186	7,647	6,910	5,890	7,134
Rango	5,547	3,770	3,111	1,539	1,244	2,135	4,107	3,174	1,609	1,987
Asimetría	,225	,008	-,104	,176	-,224	,206	,690	,488	,948	-,077
Curtosis	1,477	-1,058	-,872	-1,096	-1,688	-1,554	-,923	-,379	-,473	-1,938

**Tabla III.58. Prueba T de Student** para los valores medios de TNF- rII (ng/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

TNF-rII (ng/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	,683	,412	-2,315	62	,024
(b)			-2,315	61,989	,024
<b>Placebo</b>					
(a)	2,295	,152	-1,143	14	,272
(b)			-1,143	10,745	,278
<b>Melatonina</b>					
(a)	3,774	,072	-3,311	14	,005
(b)			-3,311	11,225	,007
<b>Coenzima</b>					
(a)	1,272	,278	,356	14	,727
(b)			,356	12,580	,728
<b>Phlebodium</b>					
(a)	2,168	,163	-3,781	14	,002
(b)			-3,781	13,020	,002

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.59. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

TNF- $\alpha$ rII	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	4,198	3	28	,014
Después	1,223	3	28	,320

**Tabla III.60. Welch.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera), pero sin asumir igualdad de varianzas entre los grupos.

TNF- $\alpha$ rII (ng/ml).	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	3,466	3	14,661	,044
Brown-Forsythe	4,236	3	16,776	,021

a. Distribuidos en F asintóticamente.

**Tabla III.61. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (TNF- $\alpha$  rII en plasma) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
TNF- $\alpha$ rII (ng/ml).	Placebo	Melatonina	-1,330857*	,500489	,013
		Coenzima	-1,652482*	,500489	,003
		Phlebodium	-1,269107*	,500489	,017
DMS	Melatonina	Placebo	1,330857*	,500489	,013
		Coenzima	-,321625	,500489	,526
		Phlebodium	,061750	,500489	,903
DMS	Coenzima	Placebo	1,652482*	,500489	,003
		Melatonina	,321625	,500489	,526
		Phlebodium	,383375	,500489	,450
DMS	Phlebodium	Placebo	1,269107*	,500489	,017
		Melatonina	-,061750	,500489	,903
		Coenzima	-,383375	,500489	,450

**Tabla III.62. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (TNF- $\alpha$  rII en plasma) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

TNF- $\alpha$ rII (ng/ml).	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
t de Dunnett (bilateral) <sup>a</sup>	Melatonina	Placebo	1,330857*	,500489	,034
		Coenzima	1,652482*	,500489	,007
		Phlebodium	1,269107*	,500489	,045

**Tabla III.63. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

TNF- $\alpha$ rII (ng/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	22,659	3	7,553	10,999	,000
Intra-grupos	19,228	28	,687		
Total	41,887	31			



**Tabla III.64. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>TNF-<math>\alpha</math>_rII (ng/ml).</b>	Placebo	Melatonina	-1,951500*	,414343	,000
		Coenzima	-,925625*	,414343	,034
		Phlebodium	-2,070500*	,414343	,000
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	1,951500*	,414343	,000
		Coenzima	1,025875*	,414343	,020
		Phlebodium	-,119000	,414343	,776
	Coenzima	Placebo	,925625*	,414343	,034
		Melatonina	-1,025875*	,414343	,020
		Phlebodium	-1,144875*	,414343	,010
Phlebodium	Placebo	2,070500*	,414343	,000	
	Melatonina	,119000	,414343	,776	
	Coenzima	1,144875*	,414343	,010	

**Tabla III.65. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (TNF- $\alpha$ \_rII en plasma) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

TNF- $\alpha$ _rII (ng/ml).	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	1,951500*	,414343	,000
	Coenzima	Placebo	,925625	,414343	,085
	Phlebodium	Placebo	2,070500*	,414343	,000

**Tabla III.66. Descriptivos.** Valores de Viscosidad plasmática (mpascal) antes y después del ejercicio.

Viscosidad (mpascal)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32(29 v)	8	8	8	8(7 v.)	8	8(7 v)	8	8(7 v)
Media	1,199	1,068	1,195	1,081	1,179	1,105	1,215	1,039	1,209	1,044
Error típico	,008	,017	,008	,045	,009	,032	,030	,036	,011	,023
Desv. típ.	,049	,096	,024	,127	,026	,086	,087	,095	,031	,063
Varianza	,002	,009	,001	,016	,001	,007	,008	,009	,001	,004
Mínimo	1,031	,917	1,173	,917	1,135	,977	1,031	,941	1,175	,954
Mediana	1,193	1,050	1,186	1,125	1,177	1,142	1,229	1,018	1,197	1,043
Máximo	1,323	1,235	1,241	1,235	1,229	1,183	1,323	1,168	1,273	1,166
Rango	,292	,318	,069	,318	,093	,206	,292	,228	,098	,213
Asimetría	-,613	,013	1,255	-,330	,322	-,563	-1,375	,315	1,222	,949
Curtosis	4,131	-1,369	,698	-1,939	1,556	-1,773	2,764	-2,109	1,310	3,024

**Tabla III.67. Prueba T de Student** para los valores medios de viscosidad plasmática (mpascal) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Viscosidad (mpascal)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	24,606	,000	6,827	59	,000
(b)			6,632	41,003	,000
<b>Placebo</b>					
(a)	26,105	,000	2,470	14	,027
(b)			2,470	7,496	,041
<b>Melatonina</b>					
(a)	20,526	,001	2,330	13	,037
(b)			2,195	7,017	,064
<b>Coenzima</b>					
(a)	,782	,393	3,722	13	,003
(b)			3,699	12,356	,003
<b>Phlebodium</b>					
(a)	,377	,550	6,513	13	,000
(b)			6,239	8,591	,000

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.68. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Viscosidad	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	2,836	3	28	,056
Después	3,943	3	25	,020

**Tabla III.69. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera).

Viscosidad (mpascal).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,006	3	,002	,827	,490
Intra-grupos	,070	28	,002		
Total	,076	31			

**Tabla III.70. Welch.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio (después de la carrera), pero sin asumir igualdad de varianzas entre los grupos.

<b>Viscosidad (mpascal)</b>	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	,859	3	13,655	,486
Brown-Forsythe	,744	3	21,616	,537

a. Distribuidos en F asintóticamente.

**Tabla III.71. Descriptivos.** Valores de Melatonina en plasma (pg/ml) antes y después del ejercicio.

<b>Melatonina (pg/ml)</b>	<b>Global</b>		<b>Placebo</b>		<b>Melatonina</b>		<b>Coenzima</b>		<b>Phlebodium</b>	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	309,954	19,100	45,677	,281	1068,242	74,23	62,906	,787	62,991	1,097
Error típico	90,183	5,853	9,467	,103	185,309	5,265	7,493	,180	5,890	,345
Desv. típ.	510,156	33,112	26,777	,293	524,133	14,89	21,193	,511	16,660	,978
Varianza	260259,9	1096,4	717,045	,086	274716,3	221,7	449,169	,262	277,587	,957
Mínimo	20,230	,010	20,230	,010	532,600	56,87	36,540	,450	38,430	,200
Mediana	66,760	,675	37,070	,166	865,705	75,28	60,475	,600	63,045	,675
Máximo	1897,53	91,97	99,320	,730	1897,530	91,97	94,690	1,990	82,560	3,040
Rango	1877,30	91,96	79,090	,720	1364,930	35,10	58,150	1,540	44,130	2,840
Asimetría	2,079	1,371	1,277	,677	,738	-,068	,208	2,319	-,210	1,342
Curtosis	3,558	,110	1,268	-1,466	-1,196	-2,20	-,897	5,744	-1,423	1,151

**Tabla III.72. Prueba T de Student** para los valores medios de melatonina plasmática (pg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Melatonina (pg/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	35,25	,000	3,218	62	,002
(b)			3,218	31,261	,003
<b>Placebo</b>					
(a)	14,196	,002	4,795	14	,000
(b)			4,795	7,002	,002
<b>Melatonina</b>					
(a)	28,042	,000	5,362	14	,000
(b)			5,362	7,011	,001
<b>Coenzima</b>					
(a)	13,721	,002	8,288	14	,000
(b)			8,288	7,008	,000
<b>Phlebodium</b>					
(a)	22,803	,000	10,489	14	,000
(b)			10,489	7,048	,000

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.73. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Melatonina	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	27,342	3	28	,000
Después	52,115	3	28	,000

**Tabla III.74. Welch.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio (antes de la carrera), pero sin asumir igualdad de varianzas entre los grupos.

Melatonina (pg/ml)	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	9,871	3	14,702	,001
Brown-Forsythe	29,620	3	7,074	,000

a.Distribuidos en F asintóticamente.

**Tabla III.75. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (melatonina) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Melatonina (pg/ml).</b>	Placebo	Melatonina	-1022,565375*	131,377365	,000
		Coenzima	-17,228875	131,377365	,897
		Phlebodium	-17,313875	131,377365	,896
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	1022,565375*	131,377365	,000
		Coenzima	1005,336500*	131,377365	,000
		Phlebodium	1005,251500*	131,377365	,000
	Coenzima	Placebo	17,228875	131,377365	,897
		Melatonina	-1005,336500*	131,377365	,000
		Phlebodium	-,085000	131,377365	,999
Phlebodium	Placebo	17,313875	131,377365	,896	
	Melatonina	-1005,251500*	131,377365	,000	
	Coenzima	,085000	131,377365	,999	

**Tabla III.76. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (melatonina) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

<b>Melatonina (pg/ml).</b>	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	1022,565375*	131,377365	,000
	Coenzima	Placebo	17,228875	131,377365	,998
	Phlebodium	Placebo	17,313875	131,377365	,998

**Tabla III.77. Welch.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio (después de la carrera), pero sin asumir igualdad de varianzas entre los grupos.

<b>Melatonina (pg/ml).</b>	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	62,568	3	13,706	,000
Brown-Forsythe	193,833	3	7,082	,000

a. Distribuidos en F asintóticamente.

**Tabla III.78. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (melatonina) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Melatonina (pg/ml).</b>	Placebo	Melatonina	-73,954750*	3,733881	,000
		Coenzima	-,506000	3,733881	,893
		Phlebodium	-,816000	3,733881	,829
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	73,954750*	3,733881	,000
		Coenzima	73,448750*	3,733881	,000
		Phlebodium	73,138750*	3,733881	,000
<b>DMS</b>	Coenzima	Placebo	,506000	3,733881	,893
		Melatonina	-73,448750*	3,733881	,000
		Phlebodium	-,310000	3,733881	,934
<b>DMS</b>	Phlebodium	Placebo	,816000	3,733881	,829
		Melatonina	-73,138750*	3,733881	,000
		Coenzima	-,310000	3,733881	,934

**Tabla III.79. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (melatonina) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Melatonina (pg/ml).</b>	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)</b>	Melatonina	Placebo	73,954750*	3,733881	,000
	Coenzima	Placebo	,506000	3,733881	,998
	Phlebodium	Placebo	,816000	3,733881	,993

**Tabla III.80.Descriptivos.** Valores de capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg) antes y después del ejercicio.

<b>Cap anti (nmol/mg)</b>	<b>Global</b>		<b>Placebo</b>		<b>Melatonina</b>		<b>Coenzima</b>		<b>Phlebodium</b>	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	15,062	16,134	13,668	14,179	15,062	16,896	15,807	17,111	15,690	16,351
Error típico	,262	,278	,252	,385	,477	,379	,529	,327	,492	,445
Desv. típ.	1,484	1,573	,714	1,090	1,351	1,073	1,497	,925	1,393	1,259
Varianza	2,205	2,475	,511	1,190	1,827	1,152	2,243	,857	1,941	1,586
Mínimo	12,944	12,241	12,944	12,241	13,052	15,522	13,554	15,291	13,288	14,372
Mediana	15,061	16,347	13,622	14,251	15,192	16,934	15,666	17,201	15,503	16,339
Máximo	17,845	19,166	14,931	15,687	17,040	19,166	17,845	18,249	17,620	18,762
Rango	4,901	6,924	1,987	3,446	3,988	3,643	4,291	2,958	4,333	4,390
Asimetría	,266	-,423	,871	-,619	-,045	1,301	-,089	-,857	-,337	,557
Curtosis	-1,041	,192	-,311	,249	-,741	2,995	-1,165	1,534	-,166	1,860

**Tabla III.81. Prueba T de Student** para los valores medios de capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Cap_anti (nmol/mg)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	,008	,930	-2,805	62	,007
(b)			-2,805	61,794	,007
<b>Placebo</b>					
(a)	,791	,389	-1,066	14	,305
(b)			-1,066	12,074	,307
<b>Melatonina</b>					
(a)	,774	,394	-3,007	14	,009
(b)			-3,007	13,316	,010
<b>Coenzima</b>					
(a)	2,364	,146	-2,095	14	,055
(b)			-2,095	11,670	,059
<b>Phlebodium</b>					
(a)	,276	,607	-,995	14	,336
(b)			-,995	13,860	,337

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.82. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Capacidad antioxidativa	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	1,304	3	28	,293
Después	,122	3	28	,946

**Tabla III.83. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Capacidad antioxidativa (nmol/mg).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	22,700	3	7,567	4,641	,009
Intra-grupos	45,650	28	1,630		
Total	68,349	31			

**Tabla III.84. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (capacidad antioxidativa en plasma) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Cap_anti (nmol/mg).</b>	Placebo	Melatonina	-1,373952*	,638426	,040
		Coenzima	-2,119129*	,638426	,003
		Phlebodium	-2,001977*	,638426	,004
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	1,373952*	,638426	,040
		Coenzima	-,745177	,638426	,253
		Phlebodium	-,628024	,638426	,334
	Coenzima	Placebo	2,119129*	,638426	,003
		Melatonina	,745177	,638426	,253
		Phlebodium	,117153	,638426	,856
Phlebodium	Placebo	2,001977*	,638426	,004	
	Melatonina	,628024	,638426	,334	
	Coenzima	-,117153	,638426	,856	

**Tabla III.85. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Capacidad antioxidativa (nmol/mg).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	43,239	3	14,413	12,048	,000
Intra-grupos	33,497	28	1,196		
Total	76,736	31			

**Tabla III.86. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (capacidad antioxidativa en plasma) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Cap_anti (nmol/mg).</b>	Placebo	Melatonina	-2,717502*	,546886	,000
		Coenzima	-2,931948*	,546886	,000
		Phlebodium	-2,171807*	,546886	,000
<b>DMS</b>	Melatonina	Placebo	2,717502*	,546886	,000
		Coenzima	-,214446	,546886	,698
		Phlebodium	,545694	,546886	,327
	Coenzima	Placebo	2,931948*	,546886	,000
		Melatonina	,214446	,546886	,698
		Phlebodium	,760140	,546886	,175
Phlebodium	Placebo	2,171807*	,546886	,000	
	Melatonina	-,545694	,546886	,327	
	Coenzima	-,760140	,546886	,175	



**Tabla III.87. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (capacidad antioxidativa en plasma) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Cap_anti (nmol/mg).	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	2,717502*	,546886	,000
	Coenzima	Placebo	2,931948*	,546886	,000
	Phlebodium	Placebo	2,171807*	,546886	,001

**Tabla III.88. Descriptivos.** Valores de proteínas citosol de eritrocito (mg/ml) antes y después del ejercicio.

Prot_cit (mg/ml)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32(31v)	32	8(7v)	8	8	8	8	8	8	8
Media	20,617	16,114	22,020	13,886	19,468	16,017	20,214	13,614	20,941	20,941
Error típico	,608	,895	,280	1,880	1,292	1,424	1,039	,918	1,695	1,695
Desv. típ.	3,390	5,068	,743	5,319	3,654	4,029	2,941	2,599	4,796	4,796
Varianza	11,496	25,687	,553	28,299	13,358	16,237	8,651	6,756	23,004	23,004
Mínimo	12,509	8,535	20,987	8,535	12,509	11,083	14,949	10,967	13,329	13,329
Mediana	21,088	14,309	22,020	12,445	20,109	15,592	20,372	13,288	21,634	21,634
Máximo	26,370	26,370	23,173	23,067	24,635	23,494	24,252	19,587	26,370	26,370
Rango	13,861	17,835	2,187	14,531	12,127	12,411	9,303	8,620	13,041	13,041
Asimetría	-,721	,593	,038	,906	-,847	,891	-,635	2,027	-,465	-,465
Curtosis	,317	-,762	-,324	-,463	1,229	,437	,311	5,132	-1,192	-1,192

**Tabla III.89. Prueba T de Student** para los valores medios de proteínas en citosol de eritrocito (mg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Prot_cit (mg/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	7,554	,008	4,131	61	,000
(b)			4,131	54,287	,000
<b>Placebo</b>					
(a)	9,707	,008	3,993	13	,002
(b)			4,278	7,312	,003
<b>Melatonina</b>					
(a)	,091	,767	1,794	14	,094
(b)			1,794	13,869	,095
<b>Coenzima</b>					
(a)	,344	,567	4,756	14	,000
(b)			4,756	13,791	,000
<b>Phlebodium</b>					
(a)	,000	1,000	,000	14	1,000
(b)			,000	14,000	1,000

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.90. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Prot_cit	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	3,430	3	27	,031
Después	1,746	3	28	,180

**Tabla III.91. Welch.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio (después de la carrera), pero sin asumir igualdad de varianzas entre los grupos.

Prot_cit (mg/ml).	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	1,943	3	12,644	,174
Brown-Forsythe	,783	3	18,585	,518

a.Distribuidos en F asintóticamente.

**Tabla III. 92. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos después de la carrera.

Prot_cit (mg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	276,234	3	92,078	4,957	,007
Intra-grupos	520,077	28	18,574		
Total	796,311	31			

**Tabla III.93. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (proteínas en citosol de eritrocito) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Prot_cit (mg/ml).</b>  <b>DMS</b>	Placebo	Melatonina	-2,131524	2,154888	,331
		Coenzima	,272190	2,154888	,900
		Phlebodium	-7,055524*	2,154888	,003
	Melatonina	Placebo	2,131524	2,154888	,331
		Coenzima	2,403714	2,154888	,274
		Phlebodium	-4,924000*	2,154888	,030
	Coenzima	Placebo	-,272190	2,154888	,900
		Melatonina	-2,403714	2,154888	,274
		Phlebodium	-7,327714*	2,154888	,002
	Phlebodium	Placebo	7,055524*	2,154888	,003
		Melatonina	4,924000*	2,154888	,030
		Coenzima	7,327714*	2,154888	,002

**Tabla III.94. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (proteínas en citosol de eritrocito) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Prot_cit (mg/ml).	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	2,131524	2,154888	,638
	Coenzima	Placebo	-,272190	2,154888	,999
	Phlebodium	Placebo	7,055524*	2,154888	,008

**Tabla III.95. Descriptivos.** Valores de proteínas membrana de eritrocito (mg/ml) antes y después del ejercicio.

Prot_mem (mg/ml)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32(29v)	32(30v)	8(6v)	8	8(7v)	8(7v)	8	8	8	8
Media	4,098	3,738	4,272	3,197	3,800	3,858	4,174	3,592	4,152	4,403
Error típico	,107	,242	,320	,320	,103	,163	,240	,445	,180	,810
Desv. típ.	,581	1,329	,784	,906	,273	,431	,679	1,259	,510	2,143
Varianza	,338	1,768	,615	,822	,075	,186	,462	1,588	,261	4,595
Mínimo	3,197	1,760	3,197	1,760	3,537	3,002	3,418	2,326	3,232	2,610
Mediana	4,152	3,430	4,416	3,139	3,800	3,985	4,142	3,211	4,162	3,231
Máximo	5,547	8,488	5,332	4,917	4,173	4,312	5,547	6,142	4,944	8,488
Rango	2,350	6,728	2,135	3,157	,636	1,310	2,128	3,816	1,713	5,877
Asimetría	,654	1,815	-,190	,527	,603	-1,542	1,080	1,317	-,386	1,363
Curtosis	,329	4,687	-,868	1,796	-1,451	2,541	1,799	1,548	,890	1,303

**Tabla III.96. Prueba T de Student** para los valores medios de proteínas membrana de eritrocito (mg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Prot_mem (mg/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>	7,103	,010	1,340	57	,186
			1,355	39,977	,183
<b>Placebo</b>	,001	,976	2,322	12	,039
			2,375	11,673	,036
<b>Melatonina</b>	,868	,370	-,303	12	,767
			-,303	10,153	,768
<b>Coenzima</b>	1,968	,182	1,149	14	,270
			1,149	10,755	,275
<b>Phlebodium</b>	9,568	,009	-,322	13	,753
			-,302	6,597	,772

(a)= Se han asumido varianzas iguales.(b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.97. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Prot_mem	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	1,376	3	25	,273
Después	4,044	3	26	,017

**Tabla III.98. ANOVA. Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).**

Prot_mem (mg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,874	3	,291	,849	,480
Intra-grupos	8,580	25	,343		
Total	9,455	28			

**Tabla III.99. Welch. Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio (después de la carrera), pero sin asumir igualdad de varianzas entre los grupos.**

Prot_memb (mg/ml).	Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.
Welch	1,261	3	12,955	,328
Brown-Forsythe	1,051	3	12,736	,404

a. Distribuidos en F asintóticamente

**Tabla III.100. Descriptivos. Valores de Hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) antes y después del ejercicio.**

Hemog_ci (mg/ml)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32(31v)	32	8(7v)	8	8	8	8	8	8	8
Media	24,304	15,910	24,423	16,318	23,790	17,413	23,575	16,468	25,443	13,441
Error típico	,532	,735	,659	2,207	1,022	1,329	1,101	,995	1,349	,822
Desv. típ.	2,963	4,157	1,743	6,244	2,890	3,759	3,115	2,816	3,817	2,325
Varianza	8,784	17,288	3,040	38,996	8,357	14,131	9,704	7,931	14,572	5,408
Mínimo	19,238	11,423	21,794	11,423	19,840	12,625	19,539	13,527	19,238	11,423
Mediana	24,198	15,538	24,423	14,053	23,844	16,898	23,586	15,781	25,422	13,033
Máximo	31,112	29,459	26,904	29,459	27,655	23,146	30,060	22,846	31,112	18,337
Rango	11,874	18,036	5,110	18,036	7,816	10,521	10,521	9,319	11,874	6,914
Asimetría	,366	1,475	-,047	1,619	,201	,664	1,159	1,934	-,223	1,488
Curtosis	-,082	2,481	-,623	2,293	-1,155	-,607	2,743	4,583	-,133	2,380

**Tabla III.101. Prueba T de Student** para los valores medios de hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Hemog_ci (mg/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	1,626	,207	9,201	61	,000
(b)			9,250	56,099	,000
<b>Placebo</b>					
(a)	4,350	,057	3,309	13	,006
(b)			3,518	8,227	,008
<b>Melatonina</b>					
(a)	,293	,597	3,804	14	,002
(b)			3,804	13,134	,002
<b>Coenzima</b>					
(a)	,016	,901	4,787	14	,000
(b)			4,787	13,860	,000
<b>Phlebodium</b>					
(a)	,973	,341	7,595	14	,000
(b)			7,595	11,567	,000

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.102. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Hemog_ci	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,570	3	27	,639
Después	2,071	3	28	,127

**Tabla III.103. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos antes de la carrera.

Hemog_ci (mg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	16,846	3	5,615	,615	,611
Intra-grupos	246,668	27	9,136		
Total	263,514	30			

**Tabla III.104. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos después de la carrera.

Hemog_c (mg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	70,673	3	23,558	1,418	,258
Intra-grupos	465,269	28	16,617		
Total	535,943	31			

**Tabla III.105. Descriptivos.** Valores de hidroperóxidos en membrana de eritrocito basales (nmol/mg) antes y después del ejercicio.

Hidr_bas (nmol/mg)	Global		Placebo		Melatonina		Coenzima		Phlebodium	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32(29v)	32(30v)	8(6v)	8	8(7v)	8(7v)	8	8	8	8(7v)
Media	7,946	10,696	8,745	11,362	8,153	10,784	7,144	9,595	7,966	11,105
Error típico	,312	,328	,530	,777	,602	,440	,494	,382	,763	,836
Desv. típ.	1,682	1,800	1,298	2,199	1,593	1,165	1,399	1,081	2,158	2,211
Varianza	2,831	3,243	1,686	4,839	2,540	1,358	1,958	1,170	4,658	4,892
Mínimo	4,704	7,296	7,117	8,994	5,240	8,744	4,704	7,296	5,598	8,815
Mediana	7,742	10,494	9,002	10,912	8,636	11,317	7,413	9,887	7,742	10,155
Máximo	11,854	16,509	10,245	16,509	10,066	11,943	8,904	10,642	11,854	15,160
Rango	7,149	9,214	3,128	7,516	4,826	3,199	4,200	3,346	6,256	6,345
Asimetría	,136	1,467	-,314	2,180	-1,044	-,912	-,714	-1,559	,943	1,198
Curtosis	-,132	3,735	-2,009	5,852	1,008	-,158	-,082	2,637	,052	,758

**Tabla III.106. Prueba T de Student** para los valores medios de hidropéroxidos en membrana de eritrocito basales (nmol/mg) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Hidr_bas (nmol/mg)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	,151	,699	-6,056	57	,000
(b)			-6,064	56,937	,000
<b>Placebo</b>					
(a)	,083	,778	-2,580	12	,024
(b)			-2,780	11,531	,017
<b>Melatonina</b>					
(a)	,250	,626	-3,525	12	,004
(b)			-3,525	10,989	,005
<b>Coenzima</b>					
(a)	,484	,498	-3,919	14	,002
(b)			-3,919	13,165	,002
<b>Phlebodium</b>					
(a)	,023	,882	-2,778	13	,016
(b)			-2,773	12,641	,016

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.107. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Hidr_bas	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,482	3	25	,698
Después	,853	3	26	,478

**Tabla III.108. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Hidr_bas (nmol/mg).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9,284	3	3,095	1,106	,365
Intra-grupos	69,984	25	2,799		
Total	79,268	28			



**Tabla III.109. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Hidr_bas (nmol/mg).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14,473	3	4,824	1,576	,219
Intra-grupos	79,565	26	3,060		
Total	94,037	29			

**Tabla III.110.: Descriptivos.** Valores de hidroperóxidos en membrana de eritrocito inducidos con AAPH antes y después del ejercicio.

<b>Hidr ind (nmol/mg)</b>	<b>Global</b>		<b>Placebo</b>		<b>Melatonina</b>		<b>Coenzima</b>		<b>Phlebodium</b>	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32(29v)	32(30v)	8(6v)	8	8(7v)	8(7v)	8	8	8	8(7v)
Media	29,803	29,158	32,296	32,753	30,251	28,373	28,419	27,838	28,927	27,342
Error típico	,508	,741	1,344	1,328	,870	1,161	,763	1,086	,742	1,629
Desv. típ.	2,737	4,059	3,294	3,758	2,304	3,073	2,159	3,073	2,099	4,311
Varianza	7,493	16,480	10,851	14,124	5,309	9,449	4,665	9,445	4,409	18,586
Mínimo	25,020	21,058	28,258	29,671	26,867	21,879	25,020	23,471	25,080	21,058
Mediana	29,547	29,860	32,094	31,190	30,888	29,547	28,922	27,849	29,145	28,654
Máximo	37,412	39,199	37,412	39,199	32,731	30,782	30,944	31,871	31,961	31,770
Rango	12,392	18,141	9,154	9,528	5,864	8,903	5,924	8,400	6,881	10,711
Asimetría	,472	,122	,475	1,068	-,657	-2,000	-,764	-,084	-,575	-,541
Curtosis	1,017	,854	-,206	-,450	-1,077	4,184	-,653	-1,762	,789	-1,477

**Tabla III.111. Prueba T de Student** para los valores medios de proteínas membrana de eritrocito (mg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Hidro_ind (nmol/mg)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	2,075	,155	,714	57	,478
(b)			,719	51,008	,476
<b>Placebo</b>					
(a)	,239	,634	-,237	12	,817
(b)			-,241	11,618	,813
<b>Melatonina</b>					
(a)	,177	,681	1,293	12	,220
(b)			1,293	11,124	,222
<b>Coenzima</b>					
(a)	3,394	,087	,437	14	,669
(b)			,437	12,559	,669
<b>Phlebodium</b>					
(a)	6,209	,027	,925	13	,372
(b)			,885	8,438	,401

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.112. Prueba de homogeneidad** o igualdad de varianzas.

Hidr_ind	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,631	3	25	,602
Después	,815	3	26	,497

**Tabla III.113. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Hidr_ind (nmol/mg).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	60,171	3	20,057	3,351	,035
Intra-grupos	149,629	25	5,985		
Total	209,800	28			

**Tabla III.114. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Hidr_ind (nmol/mg).</b>  <b>DMS</b>	Placebo	Melatonina	4,379946*	1,361082	,145
		Coenzima	4,914543*	1,321237	,007
		Phlebodium	5,410969*	1,321237	,017
	Melatonina	Placebo	-4,379946*	1,361082	,145
		Coenzima	,534597	1,266161	,160
		Phlebodium	1,031022	1,266161	,306
	Coenzima	Placebo	-4,914543*	1,321237	,007
		Melatonina	-,534597	1,266161	,160
		Phlebodium	,496425	1,223227	,682
	Phlebodium	Placebo	-5,410969*	1,321237	,017
		Melatonina	-1,031022	1,266161	,306
		Coenzima	-,496425	1,223227	,682

**Tabla III.115. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH) entre grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

<b>Hidr_ind (nmol/mg).</b>	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	-4,379946	1,361082	,313
	Coenzima	Placebo	-4,914543*	1,321237	,018
	Phlebodium	Placebo	-5,410969*	1,321237	,043

**Tabla III.116. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Hidr_ind (nmol/mg).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	144,719	3	48,240	3,764	,023
Intra-grupos	333,192	26	12,815		
Total	477,910	29			

**Tabla III.117. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (hidroperóxidos en membrana de eritrocito inducidos con AAPH) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Hidr_ind (nmol/mg).</b>  <b>DMS</b>	Placebo	Melatonina	4,379946*	1,852729	,026
		Coenzima	4,914543*	1,789906	,011
		Phlebodium	5,410969*	1,852729	,007
	Melatonina	Placebo	-4,379946*	1,852729	,026
		Coenzima	,534597	1,852729	,775
		Phlebodium	1,031022	1,913490	,595
	Coenzima	Placebo	-4,914543*	1,789906	,011
		Melatonina	-,534597	1,852729	,775
		Phlebodium	,496425	1,852729	,791
	Phlebodium	Placebo	-5,410969*	1,852729	,007
		Melatonina	-1,031022	1,913490	,595
		Coenzima	-,496425	1,852729	,791

**Tabla III.118. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (hidroperóxidos en membrana de eritrocito inducidos con AAPH) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Hidr_ind (nmol/mg).</b>	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	-4,379946	1,852729	,057
	Coenzima	Placebo	-4,914543*	1,789906	,029
	Phlebodium	Placebo	-5,410969*	1,852729	,019

**Tabla III.119. Descriptivos.** Valores de 8 –hidroxiguanosina en orina (pg/ml) antes y después del ejercicio.

<b>8-hidro (pg/ml)</b>	<b>Global</b>		<b>Placebo</b>		<b>Melatonina</b>		<b>Coenzima</b>		<b>Phlebodium</b>	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
Media	,024	,037	,028	,047	,021	,033	,024	,032	,023	,035
Error típico	,001	,002	,003	,005	,003	,005	,002	,003	,002	,003
Desv. típ.	,008	,013	,010	,014	,008	,015	,007	,010	,006	,009
Varianza	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
Mínimo	,012	,004	,013	,027	,013	,004	,016	,019	,012	,025
Mediana	,023	,034	,026	,045	,019	,033	,023	,031	,022	,032
Máximo	,048	,070	,048	,070	,035	,055	,035	,046	,037	,053
Rango	,035	,067	,035	,043	,022	,052	,019	,027	,025	,028
Asimetría	,608	,242	,726	,306	,501	-,648	,209	,146	,654	1,152
Curtosis	,285	,592	1,416	-1,072	-1,464	1,240	-2,026	-1,914	2,387	,322

**Tabla III.120. Prueba T de Student** para los valores medios de 8-hidroxiguanosina en orina (pg/ml) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

8-hidro (pg/ml)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	5,447	,023	-4,505	62	,000
(b)			-4,505	51,691	,000
<b>Placebo</b>					
(a)	2,284	,153	-3,036	14	,009
(b)			-3,036	12,475	,010
<b>Melatonina</b>					
(a)	,664	,429	-1,849	14	,045
(b)			-1,849	10,895	,046
<b>Coenzima</b>					
(a)	1,045	,324	-1,790	14	,035
(b)			-1,790	12,942	,036
<b>Phlebodium</b>					
(a)	1,218	,288	-2,857	14	,013
(b)			-2,857	12,757	,014

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.121 Prueba de homogeneidad** o igualdad de varianzas.

8 hidro	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,657	3	28	,585
Después	,663	3	28	,582

**Tabla III.122. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

8-hidro (pg/ml).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,000	3	,000	,897	,455
Intra-grupos	,002	28	,000		
Total	,002	31			

**Tabla III.123. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos después de la carrera.

<b>8-hidro (pg/ml).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	3	,000	2,307	,098
Intra-grupos	,005	28	,000		
Total	,006	31			

**Tabla III.124. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (8-hidroxi guanosina en orina) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>8_hidro (pg/ml).</b>	Placebo	Melatonina	,014344*	,006470	,035
		Coenzima	,014615*	,006470	,032
		Phlebodium	,012239	,006470	,049
	Melatonina	Placebo	-,014344*	,006470	,035
		Coenzima	,000271	,006470	,967
		Phlebodium	-,002105	,006470	,747
	Coenzima	Placebo	-,014615*	,006470	,032
		Melatonina	-,000271	,006470	,967
		Phlebodium	-,002376	,006470	,716
	Phlebodium	Placebo	-,012239	,006470	,049
		Melatonina	,002105	,006470	,747
		Coenzima	,002376	,006470	,716

**Tabla III.125. Descriptivos.** Valores de Creatinina en orina (mg/dl) antes y después del ejercicio.

<b>Creat ori (mg/dl)</b>	<b>Global</b>		<b>Placebo</b>		<b>Melatonina</b>		<b>Coenzima</b>		<b>Phlebodium</b>	
	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.	Antes	Desp.
N	32(27v)	32(26v)	8(6v)	8(5v)	8(7v)	8(7v)	8(7v)	8(7v)	8(7v)	8(7v)
Media	127,592	200,357	156,955	255,621	144,204	244,209	115,580	154,347	97,825	163,042
Error típico	11,400	15,457	31,610	28,226	19,262	34,997	18,817	12,177	19,811	26,009
Desv. típ.	59,236	78,820	77,429	63,117	50,962	92,594	49,785	32,219	52,415	68,814
Varianza	3508,92	6212,63	5995,311	3983,774	2597,177	8573,815	2478,568	1038,08	2747,337	4735,484
Mínimo	15,215	86,955	30,430	171,740	58,695	89,130	52,175	104,350	15,215	86,955
Mediana	126,090	192,390	155,650	255,621	144,204	244,209	115,580	154,347	97,825	163,042
Máximo	258,695	345,650	258,695	341,305	206,525	345,650	184,785	200,000	189,130	263,045
Rango	243,480	258,695	228,265	169,565	147,830	256,520	132,610	95,650	173,915	176,090
Asimetría	,106	,308	-,539	,057	-,483	-,771	,125	-,094	,284	,234
Curtosis	-,341	-,888	1,002	,241	-,087	-,410	-1,288	-,330	1,835	-1,644

**Tabla III.126. Prueba T de Student** para los valores medios de creatinina en orina (mg/dl) para observar las diferencias significativas para un mismo grupo entre el inicio y el final del ejercicio físico.

Creat or (mg/dl)	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
	F	Sig.	t	gl	Sig.(bilateral)
<b>Global</b>					
(a)	3,012	,089	-3,809	51	,000
(b)			-3,788	46,394	,000
<b>Placebo</b>					
(a)	,058	,815	-2,281	9	,048
(b)			-,2,328	9,000	,045
<b>Melatonina</b>					
(a)	1,663	,221	-2,503	12	,028
(b)			-2,503	9,330	,033
<b>Coenzima</b>					
(a)	1,389	,261	-1,730	12	,019
(b)			-1,730	10,276	,014
<b>Phlebodium</b>					
(a)	1,513	,242	-1,995	12	,049
(b)			-1,995	11,209	,041

(a)= Se han asumido varianzas iguales. (b)= No se han asumido varianzas iguales.

**Tabla III.127. Prueba de homogeneidad o igualdad de varianzas.**

Creat or	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Antes	,279	3	23	,840
Después	1,724	3	22	,191

**Tabla III.128. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al inicio del ejercicio físico (antes de la carrera).

Creat or (mg/dl).	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14316,913	3	4772,304	1,427	,261
Intra-grupos	76915,042	23	3344,132		
Total	91231,955	26			

**Tabla III.129. ANOVA.** Prueba de igualdad de medias entre los grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Creat_or (mg/dl).</b>	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	53296,496	3	17765,499	3,831	,024
Intra-grupos	102019,415	22	4637,246		
Total	155315,911	25			

**Tabla III.130. DMS.** Comparaciones múltiples de una variable dependiente (creatinina en orina) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

Variable dependiente	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>Creat_or (mg/dl).</b>	Placebo	Melatonina	11,412083	39,873713	,777
		Coenzima	101,273750*	39,873713	,019
		Phlebodium	92,578750*	39,873713	,030
	Melatonina	Placebo	-11,412083	39,873713	,777
		Coenzima	89,861667*	36,399553	,022
		Phlebodium	81,166667*	36,399553	,036
	Coenzima	Placebo	-101,273750*	39,873713	,019
		Melatonina	-89,861667*	36,399553	,022
		Phlebodium	-8,695000	36,399553	,813
	<i>Phlebodium</i>	Placebo	-92,578750*	39,873713	,030
		Melatonina	-81,166667*	36,399553	,036
		Coenzima	8,695000	36,399553	,813

**Tabla III.131. t de Dunnett.** Comparaciones múltiples de una variable (creatinina en orina) entre grupos al final del ejercicio físico (después de la carrera).

<b>Creat_or (mg/dl).</b>	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
<b>t de Dunnett (bilateral)<sup>a</sup></b>	Melatonina	Placebo	-11,412083	39,873713	,981
	Coenzima	Placebo	-101,273750*	39,873713	,046
	<i>Phlebodium</i>	Placebo	-92,578750	39,873713	,027



Tras la exposición de los antecedentes, la hipótesis de trabajo inicial y el material y métodos empleados, una vez expuestos los resultados obtenidos, y en función de lo publicado hasta el momento en la literatura científica, procedemos a la discusión de los aspectos de mayor interés de los que se han abordado en este estudio.

A la hora de realizar la interpretación de los resultados nos centramos sobre todo en el análisis de la diferencia entre los distintos suplementos administrados sobre las variables o parámetros estudiados.

## **1. RESPECTO DE LAS VARIABLES SANGUÍNEAS.**

Una consideración a la hora de trabajar con los deportistas es que constituyen un subgrupo muestral dentro de la población, tanto por su edad como por la actividad física que realizan; por tanto los resultados son sólo válidos dentro de su grupo. Se han adoptado para la mayoría de los parámetros, los rangos de referencia estándar para la población general y se han modificado algunos rangos. En consecuencia, los valores obtenidos en condiciones basales en deportistas son similares a los de personas sedentarias, con algunas modificaciones, y estos valores son independientes del tipo de deporte, como norma general, aunque puede haber modificaciones en determinadas modificaciones deportivas. Los valores obtenidos en deportistas en condiciones basales, aunque similares a los de personas sedentarias, muestran más frecuentemente las alteraciones producidas por el ejercicio físico. Estas alteraciones deben ser conocidas para evitar errores diagnósticos. Hay que tener en cuenta que existen parámetros cuya alteración se manifiesta inmediatamente después de realizar un ejercicio, mientras que otros parámetros muestran sus alteraciones al día siguiente o días después de realizar el ejercicio, y son proporcionales a la intensidad del mismo.(Díaz Martínez, A, 2005).

Así, en un estudio en el que se analizaban los efectos de una ultramaratón sobre parámetros bioquímicos y hematológicos se observó un incremento estadísticamente significativo de los valores de bilirrubina tras la carrera, descensos significativos de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito fueron detectados a los 2 días y a los 9 días después de la prueba. La concentración de proteínas totales disminuyó significativamente, y los niveles de colesterol aunque permanecieron sin cambios inmediatamente después del ejercicio, descendieron significativamente al segundo y noveno día de la carrera (Wu, H.J., et al, 2004).

## 1.1. RESPECTO DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS BIOQUÍMICOS.

### 1.1.1. Niveles de bilirrubina total.

Resulta de la ruptura de la hemoglobina por la destrucción de los eritrocitos. Es removida por el hígado y excretada por la bilis. De la hemoglobina se aprovecha el hierro, la parte proteica es degradada y el grupo hemo es metabolizado hasta bilirrubina. Aumenta cuando ocurre una destrucción masiva de eritrocitos o una enfermedad hepática. Una parte se transporta hasta el hígado, se conjuga con el ácido glucurónico y se excreta en el duodeno. Se encuentra en dos formas: conjugada (directa) y no conjugada (indirecta). La indirecta se correlaciona con la hemólisis y la directa con el daño hepático. Niveles altos se observan en procesos obstructivos intra o extra hepáticos o causas de hemólisis. Los valores de alerta en adultos son  $> 12$  mg/dl. (*Gilberto, M., Mauricio, R., et al, 2006*).

Basándose en un estudio sobre 3.391 muestras en deportistas, se ha observado que el 1,3% de ellas se situaron por debajo del rango de referencia, un 89,9% dentro del mismo y un 8,8% por encima. Prácticamente en el 99% de las muestras analizadas en el laboratorio con bilirrubina total elevada, dicha elevación era debida al aumento de los niveles de bilirrubina no conjugada, es decir, era una hiperbilirrubinemia de origen prehepático. (*Díaz Martínez, A.E, 2005*).

En la literatura científica está descrito que hay determinados deportes, como el atletismo de fondo, donde el pisoteo continuo de la zancada durante mucho tiempo puede originar pequeñas roturas de vasos de capilares en los pies, lo cual puede causar pequeñas hemólisis por lo que puede aparecer bilirrubina elevada. Un sistema para discernir entre hemólisis intravascular y déficit de conjugación es la medición de los niveles de haptoglobina. (*Díaz Martínez, A.E., 2005*).

La bilirrubina es un antioxidante natural y aumenta cuando hay un incremento en la degradación de la hemoglobina por hemólisis de eritrocitos. Los valores normales en la bioquímica en sangre son de  $3,4 - 37$   $\mu\text{mol/l}$  (*Balcells, A, 1993*), rango en el que se encuentran nuestros valores de bilirrubina.

Las investigaciones recogidas en la literatura muestran un incremento en los niveles plasmáticos de bilirrubina después del ejercicio físico intenso. (*Chevion, S., et*

al, 2003). Similares resultados obtienen Fallon KE y col (1999) en un estudio con 9 participantes de una ultramaratón en el que analizan los cambios bioquímicos de variables en plasma. Observan incrementos significativos después del ejercicio en los valores de bilirrubina. En este estudio parece ser que existen evidencias indirectas de posible daño hepático durante el ejercicio prolongado.

En un estudio realizado para determinar los efectos de una carrera de larga distancia (100 km) con 13 participantes varones, sobre las fracciones séricas de bilirrubina se observó que la concentración sérica de bilirrubina total aumentaba significativamente después de la carrera. La disminución de los niveles séricos de haptoglobina (-66%) indicaban la presencia de hemólisis. De hecho, la carrera de larga distancia causaba incrementos en las diferentes fracciones séricas de bilirrubina lo que puede estar relacionado por la hemólisis que se producía. (De Paz, J.A., et al, 1995).

En nuestro estudio, los resultados no coinciden exactamente con lo expuesto anteriormente para todos los grupos. Después del ejercicio físico aumenta la concentración plasmática de bilirrubina sobre todo en el grupo placebo, disminuyendo en el grupo coenzima y *Phlebodium*, lo que nos podría indicar un mayor estrés oxidativo en el grupo placebo, si bien es cierto que estas diferencias observadas no son significativas.

Al inicio del ejercicio los valores más inferiores de bilirrubina corresponden al grupo melatonina. Al final del ejercicio no se aprecian diferencias significativas entre los tres grupos con suplementación y sí con respecto al grupo placebo, en el que la concentración plasmática de bilirrubina es mayor. Por tanto, parece existir un descenso en la producción de bilirrubina en los grupos que han recibido la suplementación de melatonina, coenzima y *Phlebodium*, lo que implicaría una menor destrucción de eritrocitos y un posible efecto protector de estos suplementos. Hay que tener en cuenta que la bilirrubina es un antioxidante natural del organismo, y en los grupos suplementados habría menor necesidad de producción de bilirrubina como antioxidante, no siendo así en el grupo placebo en el que al finalizar el ejercicio los valores de bilirrubina son los mayores.

### **1.1.2. Niveles de colesterol total.**

Es un compuesto lipídico, a partir del cual se van a sintetizar todas las hormonas esteroideas (por ej. cortisol, testosterona, glucocorticoides, etc), así como los ácidos

biliares y la vitamina D. Es indispensable en la formación de las membranas celulares. Se puede encontrar en forma libre o unido a proteínas transportadoras en el plasma (Díaz Martínez, A.E., 2005). Forma parte de 3 lipoproteínas denominadas según la densidad: VLDL (13%) (very low density lipoprotein) constituidas en un 52% por triglicéridos. Son materia prima para fabricar la LDL (70%) (low density lipoprotein) que por su baja densidad se deposita muy fácilmente en las capas íntimas arteriales desencadenando la aterosclerosis. La HDL (17%) (high density lipoprotein) es la que interviene para remover la LDL de las arterias. Se estimula su formación con el ejercicio y con una dieta pobre en grasas animales. La VLDL constituye una gran parte de lo que conocemos como triglicéridos, grasa que modela el organismo y es reserva orgánica. (Gilberto, A., Mauricio, R., 2006).

El colesterol se sintetiza endógenamente, aunque también se ingiere en la dieta. Es necesario mantener los niveles de colesterol dentro de unos límites para evitar su acumulación en tejidos, sistema vascular, etc, que pudiera dar lugar a enfermedad. Se puede encontrar elevado el colesterol en enfermedades genéticas como la hipercolesterolemia primaria, en la hiperlipoproteinemia secundaria, diabetes, hipotiroidismo, por aumento de la ingesta, etc. Podemos encontrar el colesterol disminuido en casos de desnutrición, cáncer avanzado, hipertiroidismo, etc.

La concentración de colesterol en plasma depende de varios factores entre los que destacan la edad, sexo, ingesta, etc. Normalmente presenta unos valores que varían con cada década de edad, aunque se puede generalizar para la población de deportistas jóvenes, entre 107 y 230 mg/dl. No obstante, diversas sociedades científicas, OMS, etc, aconsejan no sobrepasar los 200 mg/dl para reducir el riesgo cardiovascular. En un estudio de 3439 muestras de deportistas se observó que un 3,5% de los datos están por debajo del rango de normalidad, un 76,3 % está dentro del rango de normalidad y un 20,2 % por encima del rango de normalidad. (Díaz Martínez, A.E., 2005).

Los valores normales en la bioquímica en sangre son de hasta 3,10-6 mmol/l (Balcells, A., 1993).

El ejercicio puede ser beneficioso como una protección cardiovascular al disminuir la deposición lipídica e incrementar el transporte de colesterol, como lo comprobaron en un estudio con 11 atletas y 13 sujetos sedentarios como grupo control (Gupta, A.K., et al, 1999). Esto coincide con los aumentos de colesterol observados en los grupos placebo, coenzima y sobre todo *Phlebodium* tras el ejercicio, aunque dichos aumentos no han sido estadísticamente significativos.

En un estudio en el que se pretendía demostrar la existencia de estrés oxidativo durante el ejercicio extenuante y determinar la respuesta antioxidante, se tomaron muestras sanguíneas a 80 ciclistas antes y después de realizar una etapa de montaña de larga distancia (171 km). Se observó que el ejercicio inducía incrementos significativos en la actividad enzimática de la catalasa y glutatión reductasa. Los triglicéridos y el VLDL colesterol aumentaron significativamente después de la etapa ciclista permaneciendo dicha elevación incluso 3 h después. Se concluyó que el ejercicio intenso inducía estrés oxidativo por el patrón de cambio de la actividad de las enzimas antioxidantes eritrocitarias (Aquilo, A. et al, 2005).

En nuestro estudio, se pone de manifiesto que en el grupo melatonina los valores plasmáticos de colesterol disminuyen después de realizar el ejercicio físico como sucede en el estudio de Vincent y col. (2006), aumentando ligeramente en los demás grupos, lo que coincide con los resultados del estudio realizado por Fallon K.E. y col (1999), y con los resultados del estudio de Aquilo y col. (2005), salvo para el grupo melatonina. No se aprecian diferencias significativas en los demás grupos ni entre ambos periodos de tiempo ni entre grupos antes de comenzar el ejercicio físico. Al finalizar la prueba física sí existen diferencias significativas entre el grupo melatonina en el que los valores son inferiores con respecto a los restantes grupos.

Por tanto, parece ser que el ejercicio provoca un aumento en los niveles de colesterol. No siendo así en el grupo melatonina.

### **1.1.3. Niveles de fosfolípidos.**

Forman parte de las lipoproteínas del plasma y existen en forma de lecitina, cefalina y esfingomielina (Gilberto, A., Mauricio, R., 2006). Los valores normales en la bioquímica en sangre son de 2,9-5,2 mmol/l (Balcells, A., 1993). En buena parte van asociados, como otros lípidos, a globulinas del plasma, constituyendo los complejos llamados lipoproteínas. No está clara su función y ya no resulta admisible la primitiva hipótesis sobre la misión de transporte que los fosfolípidos tendrían respecto de los ácidos grasos.

Aumentan los fosfolípidos, a veces de modo concordante con los otros lípidos en la hiperlipemia esencial, en el síndrome nefrótico y en menor grado en la hepatitis aguda. Aumentan sólo los fosfolípidos y el colesterol en la cirrosis biliar y en el mixedema. Un aumento de los fosfolípidos con descenso del colesterol aparece con frecuencia en los estados terminales de desnutrición marcada y caquexia, así como en la

uremia crónica grave. (Balcells, A., 1993).

En nuestro estudio, los valores plasmáticos de fosfolípidos disminuyen después de realizarse la prueba de ejercicio físico en todos los grupos, pero sólo muestran claramente diferencias estadísticamente significativas en el grupo *Phlebodium* entre ambos periodos de tiempo. Los valores menores de concentración de fosfolípidos en plasma se encuentran en el grupo melatonina. No existen diferencias significativas entre los grupos placebo, coenzima Q10 y *Phlebodium*, ni al inicio ni al final del ejercicio, aunque sí con respecto al grupo melatonina antes de comenzar la carrera, y después, entre los grupos coenzima Q10 y *Phlebodium* respecto del grupo melatonina.

#### **1.1.4. Niveles de triglicéridos.**

Los acilglicéridos están formados por una molécula de glicerol y hasta 3 moléculas de ácidos grasos esterificados al glicerol. Forman parte de las lipoproteínas y se dividen en exógenos (suministrados al organismo al ingerir grasas saturadas) y endógenos (los que fabrica el hígado al degradar los exógenos). Son materia prima para fabricar por hidrólisis, la lipoproteína LDL, que es la que lleva el colesterol a las células. Toda lipoproteína tiene triglicéridos, pero éstos son más abundantes en los quilomicrones y en la fracción VLDL, que representa aproximadamente la quinta parte de los triglicéridos totales. (Gilberto, A., Mauricio, R., 2006).

Los triglicéridos son depósitos de energía muy concentrada puesto que están en forma muy reducida y anhidra. Constituyen el 95% de la grasa de almacenamiento y son la forma predominante de ésteres de glicerol hallados en el plasma (Tietz, 1994). El rendimiento de la oxidación completa de los ácidos grasos es de aproximadamente 9 kcal/g, mientras que de los hidratos de carbono y proteínas se obtienen aproximadamente 4 kcal/g. En consecuencia, un gramo de grasa, prácticamente anhidra, produce más de seis veces la misma energía que un gramo de glucógeno hidratado. Por ello, los triglicéridos fueron elegidos en la evolución como principal reservorio de energía (Stryer, 1995).

Las funciones principales de los triglicéridos son el depósito o almacenamiento y el suministro de energía. De hecho, el músculo en reposo utiliza como principal sustrato energético los ácidos grasos libres de los triglicéridos musculares. El músculo activo también utiliza los ácidos grasos como combustible celular, pero cuando el ejercicio es de larga duración y baja intensidad. Concentraciones elevadas de triglicéridos en plasma

pueden encontrarse como consecuencia de un aumento de la ingesta, hipotiroidismo, síndrome nefrótico, diabetes, enfermedades de almacenamiento del glucógeno, etc.; por el contrario, se encuentran valores bajos de triglicéridos en las pancreatitis agudas, dietas, ejercicio, etc.

En la literatura científica encontramos un estudio realizado sobre 3.440 muestras de deportistas, el 96,1% de las mismas estaban dentro del rango de normalidad, mientras que sólo el 1,9% se situaba por debajo y un 2,0% por encima del rango superior de normalidad. (*Díaz Martínez, A., 2005*).

Los valores normales en la bioquímica en sangre son de 0,5-2,0 mmol/l (*Balcells, A., 1993*). Los valores obtenidos en nuestros resultados se encuentran dentro de este rango.

Existen estudios que concluyen que tras el ejercicio físico intenso como es una maratón, los niveles plasmáticos de triglicéridos no cambian de forma significativa. (*Fallon, K.E, et al, 1999*).

Coincidiendo con estos trabajos, nosotros encontramos que en esta variable lo más destacable es el descenso significativo que se produce en los valores plasmáticos de triglicéridos en el grupo placebo al final del ejercicio. No se observan diferencias significativas entre los grupos al inicio del ejercicio físico, ni tampoco entre los tres grupos con suplementación al final del ejercicio aunque sí con respecto al grupo placebo en el que los valores de triglicéridos son menores. Los triglicéridos son grasas con función energética y el ejercicio disminuye su concentración en sangre, hecho que se constata en el grupo placebo, en los demás grupos disminuyen pero ligeramente, en los que parece que los aportes suplementados contribuyen a mantener constantes los niveles de triglicéridos en plasma.

Nuestros resultados no coinciden exactamente con lo expuesto en el trabajo de *Petibois y col. (2005)* en el que analiza el efecto que tiene el entrenamiento reduciendo el estrés oxidativo causado por el ejercicio físico. En este trabajo se constata un incremento de los triglicéridos plasmáticos.

#### **1.1.5. Niveles de proteínas totales en plasma.**

El plasma contiene una mezcla compleja de proteínas, entre las que se incluyen proteínas simples, así como las que están unidas a glúcidos y lípidos. La mayor parte de

estas proteínas se originan en el sistema reticulohistiocitario del hígado, a excepción de las gammaglobulinas. La proteína sérica más abundante producida por el hígado es la albúmina. Las proteínas totales están integradas por la fracción albúmina y la fracción globulina. La primera, regula la presión osmótica coloidal de la sangre, aporta la nutrición celular, interviene en el equilibrio ácido-básico, transporta los lípidos originando las lipoproteínas y sirve de medio de transporte a multitud de elementos como calcitiroxina, esteroides, hierro, cobre, vitaminas liposolubles como A, D y E. La albúmina se sintetiza en el hígado y representa más de la mitad de las proteínas presentes en el plasma. Personas con niveles inferiores al 3,2% se consideran como hipoalbuminémicos y las personas con niveles normales de albúmina casi siempre son sanas. La hipoalbuminemia puede ser causada por una ingesta proteica deficitaria o una cirrosis, la manifestación de una pérdida exógena como ocurre en una nefrosis, o pérdidas por vía digestiva o trastornos pulmonares. Como consecuencia de la hipoalbuminemia aparece edema y el estudio debe hacerse por medio electroforético. Cuando hay hemoconcentración por choque, vómitos, quemaduras, sudoración excesiva, fistulas digestivas, etc., se obtiene una falsa hiperproteinemia. (Gilberto, A., Mauricio, R., 2006).

Por tanto, las proteínas plasmáticas cumplen diversas funciones:

- Control de la distribución del líquido extracelular.
- Soporte y vehículo de varias sustancias: hormonas, vitaminas, lípidos, etc.
- Intervienen en la coagulación sanguínea.
- Defienden al organismo (anticuerpos), etc.

Las proteínas totales se encuentran en una concentración entre 6,8 y 8,3 g/100ml según (Díaz). Sobre un estudio de 3.438 muestras de una población de deportistas, el 96,8% de las mismas se situó dentro del rango de normalidad, con un 1,6% por debajo y un 1,6% por encima de dicho rango. Con estos datos, se descartan alteraciones de los valores basales de proteínas totales con el ejercicio físico. (Díaz Martínez, A., 2005).

*Kratz y col.* (2002) describen un aumento de la concentración de proteínas a las 4 horas postmaratón, que pudiera deberse a la combinación de una ligera deshidratación y del aumento del flujo de linfa, con un alto contenido en proteínas, desde el músculo en contracción al compartimento vascular. (Kratz, A., et al, 2002).

Los valores normales en la bioquímica en sangre son de 6-8 g/100ml (60-80 mg/ml) (Balcells, A., 1993). De la cifra total que integran las proteínas, entre 3,5 y 5,5



g/100ml corresponden a la albúmina y entre 1,5 y 3 g/100ml a la globulina.

En la bibliografía consultada encontramos aumentos significativos de proteínas totales plasmáticas tras el ejercicio físico intenso (*Fallon, K.E, et al, 1999*).

En nuestro estudio, los valores de los errores estándar en cada grupo son elevados, lo que significa mayor variabilidad dentro de cada grupo. Sólo en el grupo placebo los valores descienden de forma significativa entre ambos periodos de tiempo, como en el estudio de *Wu H.J y col (2004)*. En los grupos melatonina también disminuyen los valores aunque no de forma significativa y en el grupo coenzima y *Phlebodium* aumentan ligeramente. Al inicio del ejercicio los valores plasmáticos de proteínas son más altos en el grupo placebo, y no se observan diferencias significativas entre los otros tres grupos. Al final del ejercicio no existen diferencias significativas entre los grupos.

## **1.2. RESPECTO DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS INFLAMATORIOS.**

### **1.2.1. Citoquinas.**

Hay que tener en cuenta que el ejercicio representa un estrés para el organismo, lo que origina una serie de alteraciones metabólicas, celulares, etc.; también se pueden producir como consecuencia del ejercicio pequeñas roturas celulares, etc., que a veces originan pequeños sitios inflamatorios. Como consecuencia de todo lo anterior, se produce una respuesta de fase aguda con liberación de citoquinas en el sitio de la inflamación. Estas citoquinas favorecen la atracción de linfocitos, neutrófilos, monocitos y otras estirpes celulares. La literatura es amplia y prolífica en publicaciones que muestran la existencia de una leucocitosis inducida por el ejercicio. No obstante, existen distintos resultados respecto a la cuantía de la elevación de las poblaciones leucocitarias, debido sobre todo a la diversidad del tipo de ejercicio, duración e intensidad del mismo. (*Díaz Martínez, A., 2005*).

Las citoquinas son proteínas, péptidos y/o glucoproteínas solubles de bajo peso molecular que median y controlan la comunicación entre las células inmunitarias, a la vez que regulan la proliferación y diferenciación de dichas células. Son proteínas pequeñas que pueden actuar sobre la misma célula que las produce (acción autocrina) o paracrina (sobre células cercanas). Su producción está finamente regulada y es temporal. Actúan uniéndose a receptores específicos de la membrana plasmática

desencadenando una cascada de respuestas cuyo fin es modificar la expresión de determinados genes de la célula. Las citoquinas son moléculas segregadas fundamentalmente por linfocitos y monocitos. (Sigal, LH, et al,1994).

Se han descrito alrededor de 50 citoquinas, y se han clasificado de acuerdo con su actividad fisiológica básica: proinflamatoria, antiviral, inmunoestimuladora, hematopoyética, antiinflamatoria o inmunorreguladora, etc. (Nieman, DC.,1997). Se pueden incluir como citoquinas las interleukinas, como la IL-1 e IL-6, los interferones, el factor de necrosis tumoral (TNF), los factores estimuladores de colonias (CSF), los factores de crecimiento y las quimiocinas.

No sólo actúan como mediadores de la comunicación intercelular para la respuesta inmune, sino también entre otras células y órganos del cuerpo. Las citoquinas realizan diversas funciones y a su vez, diversas citoquinas pueden compartir la misma función. Por tanto, no actúan en solitario sino que existe un complejo entramado de interacciones entre ellas, pudiendo actuar de forma sinérgica o antagonista. Inducen o inhiben la producción de otras, regulan la expresión tanto de su propio receptor como de los de otras citoquinas. (Roitt, I., 2001).

Sus acciones a bajas concentraciones están muy relacionadas con otras moléculas solubles como algunas hormonas (Rhind, SG., et al,1995). Las citoquinas tienen un importante efecto neuroinmunomodulador pudiendo activar el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y provocan inhibición de los ejes hipófisis-tiroideo e hipófisis-gonadal (Payan, D.G., et al, 1986; Reighlin, S.,1993).

La mayor parte de los receptores de las citoquinas son glucoproteínas de membrana de tipo I, con un único dominio transmembrana. Sin embargo, el receptor funcional comprende en general dos o más subunidades ya que con frecuencia las citoquinas se ligan a una subunidad muy específica y con otra que es compartida por diversas citoquinas.

En contraste con el gran número de estudios sobre la respuesta del sistema inmune al ejercicio físico agudo, menos estudios se han realizado respecto al efecto del acondicionamiento físico o entrenamiento (ejercicio crónico) sobre la función inmune. La respuesta aguda a la actividad física, sobre todo cuando es intensa, está ampliamente desarrollada en la literatura científica. Una consecuencia inevitable de la realización de ejercicio físico intenso es un proceso inflamatorio agudo en los tejidos, de mayor o menor magnitud, dependiendo de las características e intensidad de dicho ejercicio (Palombo, JD., et al, 1991; Hiraishi, H., 1998). Este proceso inflamatorio lleva consigo

la producción de citoquinas proinflamatorias, entre ellas la interleukina-6 y el TNF- $\alpha$  (Smith, LL., 2000; Pedersen B.K, 1991).

En las primeras fases de la inflamación tisular, los monocitos reclutados en el lecho tisular y los sistémicos, producen citoquinas como IL-1, TNF-alfa, IL-6. La inyección de TNF-alfa e IL-6 a animales de laboratorio o humanos reprodujo la mayoría, si no todos, los aspectos de la respuesta de fase aguda (Pedersen, B.K., et al, 2000).

Tras el ejercicio de alta intensidad los tejidos se someten a un estrés que si perdura en el tiempo por una mala adaptación o recuperación provocaría una disfunción del sistema inmune. Este hecho, podría estar relacionado con el incremento de los procesos catabólicos inducidos por el aumento de cortisol y de catecolaminas, teniendo lugar también un aumento de las citoquinas proinflamatorias (Smith LL., 2000; Pedersen, B.K., et al, 1987).

No están actualmente muy documentadas las adaptaciones crónicas o modificaciones estables y mantenidas de los niveles plasmáticos de citoquinas tras la práctica continuada y regular del ejercicio físico intenso. Encontramos que la mayoría de las investigaciones y publicaciones con respecto a estos mediadores inmunológicos tratan de la respuesta aguda que se desencadena tras la realización de ejercicio físico de forma puntual.

Las investigaciones sugieren que la respuesta inflamatoria promovida por el ejercicio físico intenso está parcialmente compensada por la secreción de citoquinas antiinflamatorias. A pesar de esta respuesta, el balance del ejercicio es una inflamación, tanto más evidente cuánto mayor es la intensidad del ejercicio (Hiraishi, H., 1998). De hecho, el ejercicio físico ha servido como modelo inflamatorio de investigación (Palombo, JD., 1991), dado que tras el ejercicio aparecen las respuestas inflamatorias clásicas.

La respuesta del sistema inmune ante el ejercicio físico no siempre es igual. Existen algunos factores que podrían variar el tipo e intensidad de respuesta inflamatoria. Parece ser que la respuesta en la producción de citoquinas difiere apreciablemente según el tipo de ejercicio (Brenner, IKM., et al, 1999), según la disponibilidad de carbohidratos (Niemann, DC., et al, 1998), e incluso dependiendo de la

temperatura corporal (Gannon, GA., et al, 2000).

El ejercicio físico intenso produce un mayor incremento muscular y plasmático de los niveles de citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria (IL-1, TNF-alfa y IL-6), siendo el estrés oxidativo un estímulo para inducir la producción de citoquinas en el ejercicio. Sin embargo, los antioxidantes atenúan la repuesta de la producción de citoquinas plasmáticas en el ejercicio (Vassilakopoulos, T, et al, 2003). Estos resultados demuestran la relación entre el daño muscular, el aumento de dichas citoquinas y el mantenimiento de los procesos inflamatorios como base de la disfunción inmunológica inducida por el ejercicio intenso.

Se han identificado un gran número de citoquinas que regulan y ejercen su acción sobre multitud de procesos fisiológicos (Córdova, A., Alvarez-Mon, M., 2001). En nuestro estudio hemos evaluado cuatro citoquinas. Dos de ellas son consideradas como citoquinas proinflamatorias: la interleukina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Las otras dos citoquinas analizadas se consideran antiinflamatorias: el receptor antagonista de la interleukina 1 (IL-1ra), y receptor soluble II del TNF- $\alpha$  (TNF-IIrs).

Después del ejercicio físico intenso, tiene lugar un aumento inicial en la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ ), mientras que durante la recuperación se produce una secreción de citoquinas antiinflamatorias (IL-1ra, TNF-rsII, IL-10) (Palombo, J.D., et al, 1991). Los picos más altos de IL-6 y de TNF $\alpha$ , se encontraron inmediatamente después del ejercicio, mientras que los niveles más altos de TNF-rsII y IL-1ra se alcanzaron en la primera hora de la recuperación. Si la actividad física es de suficiente intensidad como para inducir una respuesta inflamatoria, en primer lugar se produciría una liberación de citokinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 y IL-6), y después se regularía mediante citokinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-1ra.) (Pedersen, BK, et al, 1998).

#### **1.2.1.1. Citoquinas proinflamatorias.**

Como veremos a continuación, según los resultados obtenidos en las determinaciones efectuadas en estas variables, se confirman las hipótesis que venimos desarrollando en esta investigación. El efecto protector, antioxidante e inmunomodulador sobre la respuesta inmune de los suplementos aportados. Los sujetos

que suplementaron su dieta melatonina, coenzima y *Phlebodium decumanum* mostraron tras el ejercicio físico una mayor concentración de citokinas antiinflamatorias sobre todo en los grupos melatonina y *Phlebodium*, aunque se observó un aumento de las citoquinas proinflamatorias.

#### **1.2.1.1.1. Interleukina 6.**

La interleukina-6 tiene efectos importantes sobre los hepatocitos, los linfocitos B y fagocitos mononucleares responsables de la producción de otras citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$ ) (Pedersen BK et al, 2000b; Córdova A, et al, 2001). Es una glucoproteína de entre 20 y 30 kD de masa molecular, dependiendo del origen celular y el método de preparación. Desencadena variados efectos en muchos sistemas orgánicos distintos como son la proliferación y diferenciación de las células T, diferenciación de las células B a células plasmáticas productoras de Ac y de megacariocitos a plaquetas, proliferación de las células mesangiales, actúa promoviendo el crecimiento de los queranocitos, sobre los hepatocitos en la respuesta de fase aguda que da lugar a la síntesis de proteína C reactiva, estimula la formación y actividad de los osteoclastos en la regulación del metabolismo óseo (Akira, S., et al, 1993).

Esta citoquina es un importante mediador de la respuesta aguda ante situaciones de estrés como el ejercicio físico intenso. Actúa para prevenir un nuevo daño muscular e inicia la activación de los procesos de reparación (Pedersen B.K., et al, 2000b), (Moldoveanu, A.I., et al, 2001). Parece ser que también aumenta la producción de ACTH en la hipófisis anterior (Kammuler, M.E., 1995).

Son numerosas las publicaciones científicas que informan del importante aumento de esta citoquina tras la realización de un esfuerzo físico agudo, dependiendo de la magnitud de la respuesta de la intensidad del ejercicio (Drenth, JPH., et al, 1995), (Bruunsgaard, H, et al, 1997; Ostrowski, K, et al, 1999; Moldeveanu, AI., et al, 2000).

Cuando el ejercicio físico realizado es ligero, parece ser que existe un aumento de IL-6 pero no de IL-1 y TNF- $\alpha$  (Córdova, A., et al, 2001). Sin embargo, tras el ejercicio físico intenso, la elevación de los niveles séricos de IL-6 puede aumentar hasta 100 veces respecto a niveles basales, inmediatamente después del ejercicio (Pedersen B.K., et al, 2000b; Córdova, A., et al, 2001). Además, en estos casos el aumento intenso se correlaciona con la actividad de la enzima creatin kinasa que es un marcador indirecto de daño muscular (Pedersen, B.K., et al, 2000b).

Sin embargo, los niveles de IL-6 disminuyeron después de realizarse ejercicio intenso en los grupos que tomaron antioxidantes (vitamina E, vitamina C y beta-

caroteno) con respecto al grupo placebo según el estudio realizado por *Vincent y col* (2006).

Investigaciones realizadas sobre la IL-6 muestran que la tendencia al incremento de forma exponencial y alcanzando sus picos de concentración al finalizar el ejercicio ocurre cuando el glucógeno muscular está bastante disminuido (*Gleeson, M., Bishop NC, 2002*). Se sugiere la hipótesis de que el incremento de IL-6 está relacionado con la depleción de los depósitos de glucógeno inducida por el ejercicio, incluso sin cambios en los niveles de glucemia (*Steensberg, A., et al, 2001*). Esta producción de IL-6, modulada por la disponibilidad de glúcidos tendrá efecto sobre el tejido adiposo induciendo una lipólisis. Por tanto, se puede concluir que el aumento de IL-6 está relacionado con la actividad muscular, con la intensidad de la misma, con los depósitos de glucosa y la concentración plasmática de adrenalina (*Helge, J.W., et al, 2003*).

Por otra parte, por un estudio (*Pedersen B.K. y Steensberg A. ,2002*) se sabe que si el ejercicio se realiza en hipoxia, los cambios que induce en el sistema inmune son más acentuados.

En otro estudio realizado por (*Niess A.M., 2003*), se analiza la respuesta de atletas que realizan un entrenamiento intenso a nivel del mar y a una altitud moderada (1.800 m), y observa que la IL-6 es significativamente más elevada en altura.

Tras la realización de una actividad física aguda, aunque el aumento de los niveles de IL-6 es evidente, no obstante, también parece consensuado que esta respuesta es transitoria, recuperando sus valores de reposo poco tiempo después del cese del estímulo físico. *Rivier, A., y col* (1994), estudiaron la estimulación de IL-6 en respuesta un test de potencia aeróbica máxima en cicloergómetro, se observó un incremento moderado tras el ejercicio que revertió a valores de reposo a los 20 minutos de recuperación.

*Molodveanu AI y col.*(2000) , informa de la respuesta en la secreción de IL-6 (entre otras citoquinas), en sujetos que realizaron ejercicio físico durante tres horas entre el 60 y 65% del VO<sub>2</sub>máx., se observó un gran aumento de IL-6 al finalizar el ejercicio que se mantuvo elevado durante dos horas.

Hay publicaciones que no sostienen que el ejercicio intenso y prolongado aumente a la liberación de citocinas anti y proinflamatorias. *Drenth JPH y col.* (1995), recogió muestras de sangre a 19 atletas antes y después de una carrera de 6 horas, y encontró aumentos importantes en IL-6 e IL-1ra, pero no encontró cambios en los niveles de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Los estudios realizados sobre el aporte de *Phlebodium decumanum* analizando los posibles efectos inmunomoduladores son numerosos, como por ejemplo los resultados obtenidos en un estudio en dos grupos de ciclistas, sobre el daño oxidativo y la disfunción inmune en el que se analizaba la IL-6, se encontraban sensibles mejoras en el grupo que tomaba *Phlebodium decumanum* (De Teresa C, et al, 2003).

Se puede afirmar que los deportistas que lo consumen son capaces de mantener un nivel de esfuerzo alto durante más tiempo sin signos de aparición de fatiga debido a que tiene efectos reguladores sobre el sistema inmune. (Punzón C., et al, 2001; Punzón, C., et al, 2003).

Otro trabajo encuentra en sujetos no entrenados sometidos a un programa de acondicionamiento físico de un mes, que después del tratamiento experimental, sus niveles de IL-6 después del ejercicio eran inferiores y estadísticamente significativos respecto al grupo que realizando el mismo programa no ingería *Phlebodium decumanum* (González Jurado, J.A., 2003).

En nuestro estudio, se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo. Se produce al final del ejercicio físico un aumento de IL-6 como consecuencia de la inflamación producida por el ejercicio físico intenso, que está en consonancia con lo expuesto y consultado en la literatura científica.

No obstante, no apreciamos diferencias que sean estadísticamente significativas entre los grupos cuando se comparan en un mismo periodo de tiempo, por lo que no podemos afirmar que la suplementación con melatonina, coenzima Q10 y *Phlebodium* repercuta respecto a los niveles plasmáticos de IL-6 en este caso. Al inicio del ejercicio físico es cierto que los valores medios de IL-6 en el grupo melatonina, coenzima Q10 y *Phlebodium* son muy parecidos entre si y ligeramente inferiores al grupo placebo. Sin embargo, al final del ejercicio la concentración de IL-6 más alta se corresponde con el grupo melatonina. Aquí es donde residen las dificultades a la hora de tener referencias bibliográficas, porque no encontramos datos de estudios que permitan compararlos con los nuestros.

#### **1.2.1.1.2. TNF- $\alpha$**

El TNF $\alpha$  es sintetizado por las células del sistema mononuclear fagocítico, aunque también es producido por linfocitos T, neuronas, células de Kupffer y células endoteliales siendo a su vez sus principales células diana los granulocitos, los

macrófagos y las células titulares. Muchas de las acciones del TNF- $\alpha$  coinciden con la IL-1 y IL-6, pero también existen importantes puntos de distinción (Cohen, M.C., et al, 1996). Sus principales acciones son la activación de macrófagos, granulocitos y células citotóxicas, aumento de la adherencia entre los leucocitos y el endotelio vascular, caquexia, fiebre, inducción de proteínas de fase aguda, estimulación de la angiogénesis y aumento de la producción de moléculas CPH clase I.

Muchos investigadores han encontrado que el entrenamiento de resistencia de larga duración induce aumentos plasmáticos de los niveles de TNF. Así, Ostrowsky K y col. (1998), obtuvo como resultados importantes aumentos de TNF- $\alpha$  inmediatamente después de 2.5 horas de carrera en un tapiz rodante a intensidad media. Rokitzi L y col. (1994), observan que se produce un incremento del TNF- $\alpha$  en plasma en 14 atletas de resistencia bien entrenados inmediatamente después de una maratón. Parecidos resultados consiguieron Moldoveanu A.I. y col. (2000), con aumentos de hasta un 90% en los niveles de TNF- $\alpha$  tras tres horas de ejercicios de resistencia, pero estos valores fueron disminuyendo gradualmente durante las siguientes 24 horas.

Dufaux B. y Order U. (1989) encontraron en 8 deportistas jóvenes que tras una carrera de 2,5 horas, el TNF- $\alpha$  alcanzó sus picos de concentración en plasma 60 minutos tras finalizar la carrera, pero estos niveles cayeron a por debajo de los niveles iniciales a las 2 horas, lo cual hay que tenerlo en cuenta ya que las muestras en nuestro estudio se obtuvieron inmediatamente después de finalizar la carrera. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Brenner I.K. y col. (1999), que publicaron que el TNF- $\alpha$  alcanzó su pico de concentración plasmática 72 horas después de pedalear en un cicloergómetro durante dos horas al 60% del VO<sub>2</sub>máx.

La modulación del TNF- $\alpha$  por el ejercicio según Moldoveanu A.I. y col. (2001), parece depender de la intensidad y particularmente por la duración del estímulo físico. Aunque el tiempo que permanece elevado, una vez que se retira el estímulo físico, todo indica que no es muy prolongado, de ahí la dificultad de que se detecten niveles elevados de TNF- $\alpha$  como respuesta estable al entrenamiento.

En nuestra investigación los resultados obtenidos son parecidos a la mayoría de lo expuesto en la literatura consultada. Hemos observado que se produce después de la prueba de ejercicio físico un incremento de TNF- $\alpha$  en todos los grupos (lo cual es



razonable teniendo en cuenta que es una citoquina proinflamatoria, como ocurría con la IL-6), siendo mucho mayor ese aumento en el grupo placebo y no tanto en el grupo coenzima, en los que se constatan diferencias estadísticamente significativas entre el inicio y el final del ejercicio ( $p < 0,05$ ). Los estudios que se han publicado sobre esta citoquina, informan de aumentos inmediatamente después o a las pocas horas tras el ejercicio físico. Por lo que podríamos pensar que la suplementación de melatonina, coenzima y *Phlebodium* revierte en efectos beneficiosos para los sujetos en este caso.

Los niveles de TNF- $\alpha$  tienden a disminuir en individuos que han tomado melatonina después de una actividad física intensa (Johe, P.D., Osterud, B., 2005).

Encontramos en la situación inicial que el grupo placebo muestra una media más alta (21,92 pg/ml) en la concentración de TNF- $\alpha$  y existen diferencias significativas entre este grupo y el resto, observándose también diferencias significativas entre el grupo coenzima respecto de los grupos melatonina y *Phlebodium* en los que están los valores más bajos. Una situación similar obtenemos al comparar los grupos entre si al final del ejercicio, por lo que se podría argumentar que el efecto de la melatonina y del *Phlebodium* en la disminución del TNF- $\alpha$  es más favorable, aunque necesitaríamos disponer actualmente de suficientes estudios de rigor científico para poder confirmar esta conjetura.

### **1.2.1.2. Citoquinas antiinflamatorias.**

#### **1.2.1.2.1. Receptor antagonista de la interleukina-1.**

La inflamación tisular tiene lugar con la doble finalidad de proteger al organismo de la infección y del daño tisular, y promover la reparación de los tejidos afectados. En un primer momento son atraídas quimiotácticamente las células efectoras de la respuesta inflamatoria al tejido dañado. La siguiente etapa implica la destrucción del tejido afectado mediante la infiltración de células que lo eliminan, y finalmente decae la inflamación, permitiendo la restauración estructural y del normal funcionamiento del tejido. Todo este proceso está estrictamente regulado en el organismo (Moldoveanu, A.I., et al, 2001). Un papel fundamental en este proceso lo cumplen las citoquinas antiinflamatorias, que entre otras acciones, atenúan la inflamación restringiendo la producción de citoquinas proinflamatorias y estimulando a sus receptores solubles antagonistas y proteínas de fijación (Kluth, DC., Rees, AJ, 1996).

El TNF- $\alpha$  es eliminado rápidamente de la circulación (fundamentalmente por la

acción de sus receptores solubles) (Córdova, A., Alvarez-Mon, M., 2001; Bemelmans, MHA, et al, 1996), por un proceso que consta de dos pasos. En primer lugar se inactiva por la unión a proteínas fijadoras de TNF- $\alpha$  (TNF-BP) o también por medio de alguno de los dos receptores solubles de TNF- $\alpha$  (TNF-Irs y TNF-IIrs). El siguiente paso consiste en su eliminación por vía renal y en menor grado es metabolizado en el hígado (Córdova A., Alvarez-Mon, M., 2001). Tanto los receptores solubles del TNF- $\alpha$  como la fijación a los TNF-BP, pueden reducir sensiblemente los efectos más nocivos del TNF- $\alpha$ , amortiguando de este modo su actividad y aumentando la estabilidad biológica controlando su biodisponibilidad mediante la liberación gradual al torrente circulatorio (Bemelmans, MHA et al, 1996; Moldoveanu, AI., et al, 2001).

La IL-1ra (antagonista del receptor de IL-1) es una citoquina antiinflamatoria, ya que inhibe la acción de la IL-1 (Córdova A, et al, 2001). Actúa bloqueando la fijación de la IL-1 a los receptores de la superficie celular. Se considera que esta citoquina forma parte de un mecanismo natural que restringe la extensión de los potenciales efectos perjudiciales de la IL-1 (Ruth, JH. et al, 1996). La IL-1 es producida por macrófagos y células B, además de fibroblastos, astrocitos, siendo sus células diana las células T y B, células titulares macrófagos y endotelio. Sus principales efectos son la activación de linfocitos, estimulación de macrófagos, mayor adherencia entre leucocitos y endotelio, fiebre y síntesis de proteínas de fase aguda.

Parece ampliamente aceptado que el ejercicio físico induce un claro e inmediato aumento de las citoquinas denominadas antiinflamatorias. Quizás la más estudiada o al menos sobre la que hemos encontrado mayor cantidad de publicaciones sea la IL-1ra. La mayoría de la literatura consultada informa sobre el aumento de esta citokina en respuesta a la práctica de ejercicio físico (Nieman, D.C. et al, 1997).

El ejercicio intenso induce un incremento de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  (y IL-1), junto con un considerable incremento de IL-6. A su vez esta respuesta es equilibrada por la secreción de citoquinas inhibitorias como la IL-1ra y los receptores solubles del TNF- $\alpha$ . (Ostrowski, K. et al, 1999). En un estudio realizado se pudo observar que después de una carrera de maratón, el TNF- $\alpha$  y IL-1 aumentaron sus niveles 2 veces, mientras que la IL-6 aumentó sus niveles 50 veces, y a continuación se produjo un incremento de la concentración de IL-1ra (Ostrowski, K. et al, 1998). Estos hallazgos sugieren que las citoquinas antiinflamatorias restringen la magnitud y duración

de la respuesta inflamatoria al ejercicio físico intenso, ya que la acción de las citoquinas debe regularse de forma temporal.

La mayoría de las publicaciones valoran los niveles de citoquinas inmediatamente después del estímulo generador del estrés, de este modo en el caso de las antiinflamatorias se muestran aumentos durante o justo al término del ejercicio, esperándose una recuperación de los niveles normales o incluso inferiores, a los pocas horas. *Drenth JPH y col. (1995)*, hallaron en corredores de elite un incremento de plasma de IL-1ra, inmediatamente después de una carrera de resistencia de 6 horas. Resultados similares se observaron en el análisis realizado inmediatamente después de correr una maratón (*Suzuki, K. et al, 2000*). *Ostrowsky K y col. (1998)*, por ejemplo, advirtió aumentos significativos más tardíos de esta citoquina, pero que no pasaron de entre una y dos horas tras la aplicación del estímulo físico, el cual fue de 2.5 horas de duración y al 75% del VO<sub>2</sub>máx.

A la vista de nuestros resultados tras el análisis estadístico podemos observar que los valores de IL-1 ra son bajos y similares en todos los grupos antes del ejercicio. Al final del ejercicio aumentan considerablemente los niveles de IL-1 ra en cada grupo constatándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambos periodos de tiempo. Estos resultados eran previsibles de acuerdo a lo consultado en la literatura científica si tenemos en cuenta que las extracciones de muestras sanguíneas se tomaron inmediatamente tras el ejercicio.

Al final del ejercicio se observan diferencias significativas entre los distintos grupos. Los valores más elevados corresponden al grupo melatonina seguido del grupo *Phlebodium decumanum*. Estos valores elevados de esta citoquina antiinflamatoria podrían sugerirnos el efecto inmunomodulador de la respuesta inmune de ambos suplementos.

#### **1.2.1.2.2. Receptor soluble II del TNF- $\alpha$ .**

La actividad inmunomoduladora de una fracción hidrosoluble de *Phlebodium decumanum* que previamente había mostrado actividad antiinflamatoria fue analizada in vitro. *Phlebodium* inhibe la producción de TNF por macrófagos activados con lipopolisacáridos, así como la producción de IL-6 fue parcialmente inhibida. Además el

extracto de *Phlebodium* incrementa la liberación de receptor soluble II del TNF (TNF\_rII) y del receptor antagonista de la interleuquina-1 (IL-1\_ra). Por tanto, *Phlebodium* tiene dos actividades antiinflamatorias “in vitro”: disminuye la producción de TNF- $\alpha$  (citoquina proinflamatoria) y aumenta IL-1\_ra y TNF\_rII (citoquinas antiinflamatorias) las cuales pueden neutralizar la actividad de la IL-1 y del TNF- $\alpha$ , respectivamente (Punzon C., et al, 2003).

En nuestro estudio, observamos que al inicio del ejercicio existen diferencias significativas entre el grupo placebo (en el que los valores de TNF- $\alpha$ \_rII son más bajos) y los grupos que han ingerido suplementos. A la vista de los resultados, se aprecian diferencias significativas ( $p < 0,005$  y  $p < 0,002$ ) en los grupos melatonina y *Phlebodium* entre ambos periodos de tiempo en los que después del ejercicio aumentan los niveles de esta citoquina antiinflamatoria, al contrario de lo sucedido para los valores de TNF- $\alpha$  en donde las diferencias significativas se encontraban en los grupos placebo y coenzima. Al final del ejercicio físico, los valores de esta citoquina antiinflamatoria son inferiores en el grupo placebo, seguido del grupo coenzima. Se alcanzan los valores más altos en los grupos melatonina y *Phlebodium*, similares resultados a los expuestos para la otra citoquina antiinflamatoria analizada, IL-1 ra. Por tanto, podemos afirmar que la suplementación con melatonina y *Phlebodium* es beneficiosa teniendo un efecto inmunomodulador al aumentar los niveles de citoquinas antiinflamatorias que contrarresten y limiten temporalmente los efectos de la inflamación inducida por el ejercicio físico intenso. No pudiéndose extraer iguales conclusiones para el coenzima Q10.

### **1.3. RESPECTO DE OTRAS DETERMINACIONES EN PLASMA.**

#### **1.3.1. Niveles de viscosidad plasmática.**

Las propiedades físicas del flujo de la sangre pueden ser evaluadas en los sujetos a través de la medición de parámetros como la viscosidad plasmática. Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales (tabaquismo, dislipemia, sedentarismo, obesidad...) al ser modificados permiten prevenir las patologías cardiovasculares. Es un hecho de observación clínica que en un grupo de pacientes con infarto de miocardio, entre un 10-15% de ellos no tienen aparentemente factores de riesgo imputables. Este es el motivo por el que últimamente cobra interés estudiar la reología de la sangre. Los estudios al

respecto muestran que la viscosidad sanguínea es un factor de riesgo cardiovascular (Lowe G.D., et al, 1997). En otras publicaciones se analiza la relación entre la viscosidad y la enfermedad coronaria. (Junker, R., et al, 1998).

La viscosidad plasmática depende de la concentración de proteínas en el plasma y más particularmente de macromoléculas como el fibrinógeno, que es más importante que las inmunoglobulinas o lipoproteínas el aumento de la viscosidad. (Hernán Prat, 2003).

En nuestro estudio, se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para cada grupo entre ambos periodos de tiempo, ya que los valores de viscosidad plasmática disminuyen después de realizarse la prueba de ejercicio físico. Esto es lógico si tenemos en cuenta que después del ejercicio físico se produce una hemoconcentración por pérdida de líquidos. No hay diferencias significativas para los valores de viscosidad plasmática entre los grupos ni al inicio ni al final del ejercicio. Se encuentran los valores más altos de viscosidad en el grupo coenzima y en el grupo *Phlebodium* al inicio del ejercicio físico.

### **1.3.2. Niveles de Melatonina.**

La melatonina es una molécula altamente conservada. Su presencia se remonta a los procariotas fotosintéticos. Las funciones primitivas y primarias de la melatonina serían actuar como un receptor de radicales libres y un antioxidante de amplio espectro.

En la bibliografía existen numerosos estudios que informan y especifican las funciones de la melatonina. Así, Reiter y col (2000) demuestran la función de la melatonina neutralizando radicales libres como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y estimulando enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

Muñoz-Hoyos A y col (2001) estudiaron los efectos del propanolol y el ejercicio sobre la producción de melatonina y la producción de hormona del crecimiento en niños encontrando un descenso en los niveles de melatonina plasmáticos a los 120 y 140 minutos después de realizar el test. Las conclusiones que obtuvieron fueron que existe una relación inversa entre la melatonina y la hormona del crecimiento después de realizar el ejercicio y administrar propanolol, y que la reducción de melatonina podía estar relacionada con su descenso por el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico.

*Tan DX y col* (2007) en un reciente estudio han revisado el metabolismo de la melatonina incluyendo los mecanismos reguladores, los mecanismos de análisis y funciones de sus metabolitos, los sitios de síntesis, las enzimas implicadas en dicha síntesis y la biodisponibilidad en humanos. La capacidad de atrapar radicales libres de la melatonina se amplía a su metabolito secundario, terciario y cuaternario es ahora documentada. Aparece la interacción entre la melatonina con ROS/RNS como un prolongado proceso que implica a sus derivados como un proceso en cascada. Esta cascada de reacciones es una novedosa propiedad de la melatonina que explicaría o aclararía las diferencias con respecto a otros antioxidantes convencionales. La cascada de reacciones sería altamente efectiva incluso a bajas concentraciones protegiendo a los organismos frente al estrés oxidativo. La melatonina es encontrada en tejidos y órganos que son expuestos con frecuencia a agentes hostiles como la piel, o bien órganos con un alto consumo de oxígeno, como el cerebro. La producción de melatonina puede ser regulada debido a una restricción calórica en ratas o por el ejercicio físico en humanos. Un intenso estrés oxidativo provocaría una rápida caída de los niveles plasmáticos de melatonina. Este descenso no estaría relacionado con una menor síntesis aunque si con un apresurado consumo ya que sería rápidamente metabolizada por su interacción con las especies reactivas de Oxígeno y Nitrógeno inducidas por el estrés. Por tanto, la melatonina es usada como una primera línea defensiva contra el daño oxidativo. A su vez, el estado oxidativo del organismo modifica el metabolismo de la melatonina. En el estudio se informa que cuanto más alto es el estado oxidativo, más melatonina es producida. Incluso la tasa de melatonina y otro metabolito suyo (3-hidroximelatonina) pueden servir como indicadores del nivel de estrés oxidativo en los organismos.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación corroboran lo encontrado en la literatura científica consultada. Al inicio del ejercicio los valores más altos aparecen en el grupo que tomaba melatonina como era previsible, observándose diferencias significativas con respecto a los otros tres grupos en los que los valores son similares. En nuestras determinaciones hemos encontrado diferencias significativas en todos los grupos entre el inicio y el final del ejercicio físico ya que después de la prueba de ejercicio físico descienden los niveles plasmáticos de melatonina en todos los grupos debido a que el ejercicio induce estrés oxidativo y según lo informado en la documentación consultada se consumiría melatonina que actuaría como antioxidante erradicando radicales libres. Al finalizar el ejercicio es interesante apreciar que los valores más bajos de melatonina están en el grupo placebo encontrándose niveles más

altos y similares en los grupos coenzima y *Phlebodium*. Esto nos podría indicar que en los grupos coenzima y *Phlebodium* no se produce un descenso tan rápido en los niveles plasmáticos de melatonina para frenar el estrés oxidativo como en el grupo placebo porque no sería necesario, al tener actividad antioxidante tanto el coenzima Q10 como el *Phlebodium*.

### **1.3.3. Niveles de capacidad antioxidativa en plasma.**

Son numerosos los estudios en los que se afirma que el ejercicio incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno hasta un punto en el que se pueden exceder las defensas antioxidantes y causar estrés oxidativo. Así, *Chevion S y col* (2003) informan que el ejercicio intenso conduce a un incremento en la tasa metabólica, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno debido a la elevación de la tasa respiratoria y comprometiendo los sistemas de defensa antioxidantes.

*Watson TA y col* (2005) realizaron un estudio con 20 atletas varones y 20 varones sedentarios en el que analizaban varios antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo. La capacidad antioxidativa total tendía a ser más baja significativamente en los atletas que tomaron antioxidantes respecto al grupo control.

En un estudio realizado con 37 corredores de maratón para observar los efectos de la suplementación con coenzima Q10 y alfa-tocoferol sobre el estrés oxidativo inducido por el ejercicio y el daño muscular, se comprobó que el ejercicio incrementa la peroxidación de los lípidos plasmáticos y también eleva la capacidad antioxidativa del plasma (*Kaikkonen, J., et al, 1998*).

La valoración de los resultados de los niveles de la capacidad antioxidativa en plasma son quizás de los más significativos y reveladores de los realizados en esta investigación. En nuestro estudio, al inicio del ejercicio los valores más bajos corresponden al grupo placebo y encontramos diferencias significativas entre éste grupo y los tres restantes en los que los valores son similares. Hemos encontrado diferencias significativas en los grupos melatonina y coenzima entre ambos periodos de tiempo, aunque no en el grupo *Phlebodium*. Al final del ejercicio como era previsible, los niveles de capacidad antioxidativa en plasma es superior en los grupos que tomaron suplementos con respecto al grupo placebo, mostrando valores similares en los tres

grupos melatonina, coenzima Q10 y *Phlebodium*.

#### 1.4. RESPECTO DE LAS DETERMINACIONES EN ERITROCITO.

Un indicador de ejercicio crónico es la comparación de los valores basales hematológico-inmunológicos en sujetos controles y en deportistas habituales. Como consecuencia, estos resultados basales pueden ser utilizados como indicadores de las variaciones que produce el ejercicio crónico. (Pedersen, B.K., 2000).

Las últimas investigaciones relacionan el ejercicio de moderado a exhaustivo, con la pérdida de sangre, así como con la ruptura de los eritrocitos debida a eventos mecánicos, osmóticos y oxidativos. (Smith, J. et al, 1995). Los eritrocitos se alteran cuando se produce un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes y, evidentemente, se alteran por la hipoxemia. La mitocondria es una fuente de EROs, porque al hacer ejercicio aumenta la tasa de consumo de oxígeno en los tejidos.

Desde hace tres décadas se estableció que el ejercicio puede causar anemia siendo causa a su vez de una deficiencia en la oxigenación de los tejidos. Ahora es más clara la asociación entre el ejercicio crónico y el deterioro en el número y forma de los eritrocitos. Existe un número creciente de investigaciones que informan cambios tanto en los índices fisiológicos de los eritrocitos, como en la eritropoyesis misma, después de una sesión de ejercicio físico de alta intensidad (Fallon, K., 2004).

El ejercicio produce una hemoconcentración como consecuencia de la pérdida de líquidos a través del sudor y de la distribución de agua intra y extravascular. Además, como resultado del ejercicio físico se producen cambios metabólicos que originan alteraciones hematológicas, tanto en el número total como en las distintas estirpes celulares.

Se debe diferenciar entre ejercicio agudo y ejercicio crónico (realizado durante largos periodos de tiempo o de realizado de forma habitual). En el ejercicio agudo se producen alteraciones durante y después del ejercicio, mientras que en el ejercicio crónico las alteraciones son a largo plazo.

Se postula que las alteraciones del ejercicio agudo se producen como consecuencia de la liberación de adrenalina, mientras que las variaciones del ejercicio crónico estarían más influenciadas por el cortisol. (Díaz Martínez, A. et al, 2005).

Petibois C. y Deleris G. (2005) realizaron un estudio con 15 sujetos a los que sometían a un ejercicio de resistencia a un 75% de  $VO_2$  durante 19 semanas de entrenamiento. Tomaron muestras sanguíneas antes y después del ejercicio para analizar



cambios inducidos por la actividad física en las concentraciones plasmáticas y en parámetros eritrocitarios. En dicho estudio informan que el entrenamiento del ejercicio reduce la susceptibilidad de los eritrocitos al estrés oxidativo existiendo una correlación entre los cambios plasmáticos y los parámetros eritrocitarios.

El ejercicio intenso induce daño oxidativo en las células sanguíneas como eritrocitos y linfocitos, pero no en neutrófilos. Se realizó un estudio para ver la capacidad del plasma y células sanguíneas para detoxificar peróxido de hidrógeno después del ejercicio intenso y su correlación con el daño oxidativo. Se demostró que el ejercicio induce hemólisis y linfopenia, inversamente relacionadas con marcadores celulares de daño oxidativo. (Sureda, A. et al, 2005).

Según un estudio realizado la melatonina protege a los eritrocitos de la hemólisis por daño oxidativo siendo consumida en la defensa de estas células (Tesoriere L., et al, 1999).

#### **1.4.1. Niveles de proteínas de citosol de eritrocito.**

Los eritrocitos transportan oxígeno a los tejidos y el estrés oxidativo inducido por el ejercicio incrementa el daño eritrocitario y su movimiento. El uso de suplementos antioxidantes puede proteger o potenciar los mecanismos antioxidantes de los eritrocitos durante el entrenamiento. Marsh S.A. y col (2006) examinaron los efectos de suplementos como el ácido lipoico y el  $\alpha$ -tocoferol y/o un programa de entrenamiento sobre las defensas antioxidantes de eritrocitos en ratas macho Wistar durante 14 semanas. La combinación de suplementación con antioxidantes y el entrenamiento repercutía significativamente incrementando la actividad de enzimas antioxidantes (glutathion peroxidasa, catalasa) no observándose aumentos significativos en los grupos que sólo tenían entrenamiento o suplementación. En otro estudio los resultados indican que el entrenamiento reduce la susceptibilidad de los eritrocitos al estrés oxidativo. (Petibois, C., 2005).

Después de finalizar la prueba de ejercicio físico disminuyen los valores de proteínas de citosol en los grupos placebo y coenzima Q de forma significativa. En el grupo melatonina también descienden pero no significativamente, manteniéndose estables en el grupo *Phlebodium*. Comparando los grupos antes del ejercicio observamos que no existen diferencias significativas entre ellos, al contrario de lo que sucede al finalizar el ejercicio en donde sí se aprecian diferencias significativas entre el grupo *Phlebodium* en el que los valores son más altos con respecto a los otros tres

grupos con niveles de proteínas de citosol de eritrocito similares.

#### **1.4.2. Niveles de proteínas de membrana de eritrocito.**

El ejercicio físico se caracteriza por un incremento en el consumo de oxígeno por todo el organismo. Esto conduce a un descenso en los niveles de antioxidantes que podría promover un incremento del daño a la membrana eritrocitaria con la consecuente modificación de la fluidez de membrana. *Cazzola R. y col* (2003) realizaron un estudio en el que analizaban diferentes marcadores de estrés oxidativo, fluidez de membrana de eritrocitos y estado antioxidante en 20 jugadores de fútbol profesionales y 20 sujetos sedentarios como grupo control. Los deportistas mostraron niveles más altos de antioxidantes plasmáticos y una mayor fluidez de membrana eritrocitaria.

Otras investigaciones han encontrado que el grupo hemo de la hemoglobina se relaciona con la oxidación de las proteínas de membrana de eritrocito (*Comporti, M. et al, 2002*).

A la vista de nuestros resultados no apreciamos diferencias significativas entre los grupos en los valores de proteínas de membrana de eritrocito antes de comenzar la prueba de ejercicio físico aunque los valores son ligeramente más bajos en el grupo melatonina. Tan sólo en el grupo placebo se observa un descenso después del ejercicio que es significativo. Los valores de proteínas de membrana al final del ejercicio entre los grupos que han tomado suplementación son similares y no significativos entre sí tampoco respecto al grupo placebo.

#### **1.4.3. Niveles de Hemoglobina en citosol de eritrocito.**

*Deleris G y col* (2005) indicaron que el estrés oxidativo producido por el ejercicio afecta fuertemente a los eritrocitos. Sujetos que realizaron 120 minutos de ejercicio de intensidad progresiva analizando posteriormente con espectrofotometría IR los cambios estructurales eritrocitarios. Encontraron que después del ejercicio físico en el estrés oxidativo inducido por el ejercicio ocurre una peroxidación de fosfolípidos relacionada con el  $VO_2$ máx, un descenso de la hemoglobina por desnaturalización, lactoacidosis y hemoconcentración. El ejercicio puede afectar la concentración de Hb ya que es posible encontrar modificaciones en sus valores por ejemplo debido a la hemoconcentración, o a cambios en el grado de hidratación del individuo. (*Balaban, E., 1989*).

Varios autores han descrito un incremento significativo en la destrucción de

eritrocitos después del ejercicio físico intenso y la intensidad de la hemólisis depende de la distancia recorrida. (O' Toole M et al, 1988). Una de las causas de esta hemólisis consiste en que después de un ejercicio fuerte los eritrocitos son más susceptibles al estrés, sea de tipo mecánico, oxidativo u osmótico (Smith, J. et al, 1995). El estrés oxidativo puede alterar la homeostasis iónica y facilitar la deshidratación celular. Estos cambios disminuyen la deformabilidad del eritrocito, lo que a su vez impide su paso a través de la microcirculación. (Smith J, et al, 1995).

Si existe lesión tisular causada por el ejercicio físico intenso, la activación de los neutrófilos se convierte en una fuente de EROs (Ji, L., 1996; Peaje, J. et al, 2004). Estas células activadas pueden causar peroxidación lipídica en células vecinas como los eritrocitos, debido a que sus productos son capaces de atravesar la membrana celular y producir oxidación de la Hb, para dar lugar al proceso de hemólisis (Weiss, S., 1982). Se ha podido establecer que el hierro y el grupo hemo de la hemoglobina son fuentes potenciales de ROS (Leeuwenburgh, C. et al, 2001). Además la acción antioxidante de los ROS sobre las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y sobre los lípidos de membrana de eritrocito, se ha asociado con la hemólisis.

En nuestro trabajo encontramos que los valores de hemoglobina en citosol de eritrocito son similares en todos los grupos antes de comenzar el ejercicio físico. Se observan diferencias significativas en cada uno de los grupos entre ambos periodos de tiempo ya que después del ejercicio los valores descienden en todos los grupos, lo cual es lógico, si tenemos en cuenta que el ejercicio físico provoca un estrés oxidativo en el que se produce desnaturalización de la hemoglobina como se constata en la bibliografía consultada. En este caso no podemos afirmar que los suplementos ingeridos influyan sobre el descenso de hemoglobina al final del ejercicio ya que no hay diferencias significativas entre los grupos, aunque es cierto que en los grupos melatonina y coenzima los valores son ligeramente superiores.

#### **1.4.4. Niveles de hidroperóxidos en membrana de eritrocito basales.**

Los niveles de hidroperóxidos de las membranas de eritrocitos basales es una medida suficientemente fiable del grado de estrés oxidativo que existe en tales células sanguíneas después del ejercicio físico intenso (Mataix Albert, B., 2005)

Hay que tener en cuenta que el estrés oxidativo de las membranas eritrocitarias está estrechamente relacionado con la composición lipídica de tales membranas, de tal manera que existen numerosos estudios realizados en situaciones fisiológicas y patológicas, empleando animales y humanos en los que se afirma que las grasas poliinsaturadas (aceite de girasol, por ejemplo) generará membranas más vulnerables al daño oxidativo que las grasas monoinsaturadas (aceite de oliva, por ejemplo). (Quiles, J.L. et al, 1999; Quiles, J.L. et al, 2002; Ochoa, J.J. et al, 2002; Ochoa, J.J. et al, 2003; Quiles, J.L. et al, 2005). No encontramos datos de estudios en los que se indique si el ejercicio modifica la composición lipídica de las membranas.

En un estudio realizado para investigar el efecto de suplementos antioxidantes (beta-caroteno, vitamina E, vitamina C, selenio y zinc) sobre el incremento del estrés oxidativo durante el ejercicio a moderada altitud (2.700 m) que supone un incremento del gasto energético y anoxia tisular, se obtuvieron como resultados un incremento en los niveles de hidroperóxidos en el grupo placebo después del ejercicio, pero no en el grupo que tomó suplementos. Los resultados de este estudio sugieren que el ejercicio a una altitud moderada, como es el caso de la prueba de nuestro estudio, está acompañada de un incremento del daño oxidativo (Pfeiffer, J.M. et al, 1999). En otra prueba realizada a gran altitud (4300 m), se constatan incrementos en los niveles de hidroperóxidos tras el ejercicio, pero en este caso la suplementación con antioxidantes no afecta significativamente a los marcadores de daño oxidativo asociados con el incremento del gasto energético a gran altitud. (Subudhi, A.W. et al, 2004).

Podemos apreciar en nuestro trabajo que tras el ejercicio físico se produce un aumento de hidroperóxidos en membrana de eritrocito basales en todos los grupos ya que el ejercicio físico intenso induce estrés oxidativo. El incremento de hidroperóxidos basales es mayor ligeramente en el grupo placebo que en los grupos que ingirieron los suplementos supuestamente antioxidantes lo que se ajusta con los resultados del estudio de *Vicent y col.* (2006), y que coincide con lo expuesto en la literatura consultada, e indica un menor índice de daño oxidativo en los grupos que han ingerido tales suplementos, aunque si bien es cierto, no se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, pero podríamos pensar de acuerdo con uno de los objetivos de este estudio que es valorar la capacidad antioxidante de estos suplementos que cumplen tal función, siendo el grupo coenzima en el que tras el ejercicio aparecen los valores más bajos de hidroperóxidos por lo que tendría mayor protección

antioxidativa.

#### **1.4.5. Niveles de hidroperóxidos en membrana de eritrocito inducidos con AAPH.**

Con la finalidad de observar mejor la defensa frente al daño oxidativo se indujo una agresión oxidativa con el compuesto AAPH (Azobis-amidinopronano) que es un compuesto capaz de generar radicales libres (*Mataix Albert, B., 2005*).

En este caso, los resultados obtenidos difieren ligeramente respecto a los niveles de hidroperóxidos basales, sobre todo cuando analizamos el efecto que produce el ejercicio físico en cada grupo. Cuando se comparan los valores obtenidos en cada uno de los grupos después de finalizar la prueba de ejercicio físico no aparecen diferencias significativas sino que encontramos valores similares entre ambos periodos de tiempo. Sin embargo, comparando los cuatro grupos en el mismo periodo de tiempo (al finalizar el ejercicio), se aprecia que existen diferencias significativas entre el grupo placebo y los otros tres grupos con suplementación en los que los valores son similares. En el grupo placebo se obtienen mayores niveles de hidroperóxidos inducidos lo que muestra un mayor daño oxidativo causado por la actividad física, mientras que la melatonina, el coenzima Q y el *Phlebodium* parece que condicionan en los eritrocitos una mayor protección oxidativa.

## **2. RESPECTO DE LAS VARIABLES EN ORINA.**

### **2.1. Niveles de 8-hidroxi guanosina en orina.**

Las células continuamente producen radicales libres como parte de sus procesos metabólicos. El ejercicio puede romper el equilibrio entre EROs y antioxidantes causando estrés oxidativo en el que una de las macromoléculas diana de daño es el ADN. No está del todo claro que el ejercicio incremente la necesidad de antioxidantes adicionales en la dieta. (*Urso, M.L., Clarkson PM., 2003*).

La energía requerida durante el ejercicio físico causa una mayor demanda de oxígeno para suministro de los tejidos, lo que supone una mayor producción de radicales libres y afecta a la capacidad de los sistemas endógenos de defensa celulares. Esto repercute en modificaciones en las bases del ADN, de entre las cuales la 8-hidroxi guanosina es la más importante y ha sido usada como un biomarcador de

lesiones oxidativas in vivo. (Pilger, A. et al, 1997).

Inoue, T. et al (1993), comprobaron la elevación en los niveles de 8-hidroxiguanosina en orina después de pruebas de natación o en carreras de larga distancia, y supusieron que la reparación del daño oxidativo al ADN está aumentada por el ejercicio. Sin embargo, en un estudio en el que se medían los niveles de 8-OHdG en leucocitos humanos para evaluar el daño oxidativo en el ADN y su relación con el consumo de tabaco, alcohol y ejercicio físico moderado, no se modificaron dichos niveles significativamente con el ejercicio moderado, sí con el hábito tabáquico (Lodovici M, et al. 2000).

En el estudio sobre el efecto de antioxidantes (beta-caroteno, vitamina E, vitamina C, selenio y zinc) sobre marcadores de daño oxidativo en el ejercicio a moderada altitud tanto en el grupo placebo como en el grupo con suplementación, se observan incrementos en los valores de 8-hidroxiguanosina estadísticamente significativos después del ejercicio (Pfeiffer, J.M. et al, 1999). Además en otra investigación con 18 deportistas varones que realizaron 60 min en un cicloergómetro se apreciaron incrementos estadísticamente significativos en los valores de 8-hidroxiguanosina en muestras tanto al finalizar el ejercicio como al día después. Esto demuestra que una hora de ejercicio puede inducir daño oxidativo. (Orhan, M., et al, 2004).

Asami, S. y col (1998) investigaron los efectos del ejercicio físico espontáneo y forzado sobre los niveles de 8-hidroxiguanosina, un indicador de daño oxidativo del ADN, en órganos de ratas (corazón, pulmón e hígado). Establecieron tres grupos experimentales: un grupo con ejercicio espontáneo, un grupo con ejercicio forzado y otro grupo sedentario control. Los resultados demostraron que la intensidad del ejercicio es un importante determinante en el daño al ADN y que el ejercicio espontáneo es beneficioso para mantener un nivel bajo de daño oxidativo en el ADN.

Hemos observado al inicio del ejercicio físico que no existen diferencias significativas entre los grupos aunque, si bien es cierto que, los valores son más altos aparecen en el grupo placebo siendo similares en los tres grupos con suplementación. En nuestro estudio los resultados nos muestran claramente la existencia de diferencias significativas en cada grupo entre ambos periodos de tiempo, aumentando los valores de 8-hidroxiguanosina después de finalizar la prueba de ejercicio físico. Tenemos a nuestra

disposición documentación consultada en la que se considera que la elevación de los niveles de 8-hidroxi-guanosina es un signo objetivo del daño al ADN como consecuencia del estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico (Loft S et al, 1993; Inoue, T. et al, 1993; Pilger, A. et al, 1997; Pfeiffer, J.M. et al, 1999; Urso, M.L., et al, 2003; Orhan, H., et al, 2004).

Por tanto, es congruente que constatemos en nuestra investigación al final del ejercicio físico, un aumento de los valores de esta variable en orina en todos los grupos, siendo ese aumento mayor en el grupo placebo y con diferencias significativas con respecto a los otros tres grupos en los que aparecen resultados similares. Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos se confirma el papel protector de los suplementos empleados frente al estrés oxidativo inducido en el ejercicio físico intenso.

## **2.2. Niveles de Creatinina en orina.**

La creatinina es un producto de degradación de la creatina, la cual es una parte importante del músculo. La creatina es un compuesto orgánico derivado de los aminoácidos y muy similar a ellos en cuanto a estructura molecular. Se sintetiza en el hígado, páncreas y riñones a partir de aminoácidos como la arginina, glicina y metionina. La creatina también se encuentra presente en alimentos plásticos como la carne, el pescado, los productos lácteos y el huevo. Se comercializa en forma de suplemento dietario, sobre todo en dietas que buscan un aumento del músculo.

La fuente más importante de energía dentro de las fibras musculares es el ATP, con sus enlaces fosfato de alta energía. Cuando se produce la hidrólisis de uno de estos enlaces, se libera energía y el ATP se convierte en ADP. La fosfocreatina representa una fuente de energía de reserva porque interviene en la fosforilación del ADP en ATP. Por eso, por sus funciones relacionadas con la resíntesis de ATP en el músculo ante esfuerzos de origen anaeróbico, de elevada intensidad y corta duración, la suplementación con creatina es utilizada por deportistas. La producción diaria de creatina y posteriormente de creatinina depende de la masa muscular, la cual fluctúa muy poco en la mayoría de las personas normales durante largos periodos de tiempo. La creatinina es, por tanto, un producto de desecho que se elimina por la orina. Es producida por el organismo en cantidad constante y eliminada de forma también constante, si la función renal es normal. La cantidad producida y eliminada de creatinina por día no depende de la alimentación (a diferencia de la urea). Los valores normales

son altamente dependientes de la edad y la masa muscular de la persona a quien se la toma la muestra de orina. Los valores de referencia de creatinina en orina en adultos sanos son muy variables y pueden fluctuar de 500 mg/24 h a 2.000 mg/24 h, aunque hay otras fuentes bibliográficas que indican valores de 0,13-0,22 mmol por kg /24 h ( $< 40$  mg/24 h (varón) o  $< 0,75$  mmol/24 h) (Balcells, A, 1993). El riñón tiene una gran capacidad de reserva, lo que puede enmascarar la existencia de un posible trastorno en su función depuradora.

Encontramos en nuestra investigación que en cada uno de los grupos al finalizar el ejercicio aumentan los niveles de creatinina en orina (mg/dl) encontrándose diferencias significativas entre el inicio y el final del ejercicio, lo cual es lógico y coincide con lo encontrado en la bibliografía, ya que el ejercicio supone un gasto energético por lo que aumenta el consumo de fosfocreatina por el músculo y su degradación a creatinina. Antes de comenzar el ejercicio físico los valores más altos de creatinina en orina se corresponden con el grupo placebo, siendo similares en los grupos con suplementación aunque no se constatan diferencias significativas entre los cuatro grupos. Sin embargo, comparando los grupos al finalizar el ejercicio encontramos que aparecen los valores más altos y similares entre sí en el grupo placebo y melatonina, en los que el gasto de creatina ha sido mayor, mostrando diferencias significativas con respecto al grupo coenzima y *Phlebodium* en los que el aumento de creatinina en orina tras el ejercicio ha sido menor.



Como consecuencia de los resultados presentados y de todo lo expuesto en la discusión de este estudio, podemos concluir que:

1. Tras la realización de la prueba de ejercicio físico intenso y fatigante los sujetos de este estudio manifiestan respuestas inflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y se confirma la presencia de un estrés oxidativo inducido por el ejercicio como indican los mayores niveles plasmáticos, eritrocitarios e indicadores de daño oxidativo analizados (capacidad antioxidativa total, 8-hidroxiguanosina...).
2. Los grupos que han ingerido suplementos presentan al finalizar el ejercicio respuestas minimizadas de inflamación (TNF- $\alpha$ ) y un aumento de los niveles de citoquinas antiinflamatorias (IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ <sub>rII</sub>) con respecto al grupo placebo, lo cual pone de manifiesto el efecto modulador sobre la disfunción inmune provocada por el ejercicio físico de estos suplementos, sobre todo la melatonina y el preparado a base de *Phlebodium decumanum*.
3. Por otra parte, los mejores resultados obtenidos en los parámetros de estrés oxidativo en los grupos que han ingerido suplementos evidencian un papel antioxidante de estos productos con respecto al grupo placebo, al proteger frente al daño oxidativo siendo en este caso mayor el efecto beneficioso en el grupo melatonina y coenzima como se observa para los biomarcadores de capacidad antioxidativa total en plasma y 8-hidroxiguanosina en orina.
4. Por lo tanto, la ingesta de melatonina, coenzima y el preparado a base de *Phlebodium decumanum* supondrían una protección frente a los efectos adversos derivados de la práctica físico-deportiva como son el estrés oxidativo y la inflamación, repercutiendo en una mayor defensa antioxidante del organismo frente a la cascada oxidativa y mejorando la inmunoprotección, lo que resulta ventajoso para los practicantes de actividad física como hábito saludable para mejorar la calidad de vida.

Hay que considerar el elevado número de publicaciones que se realizan en la actualidad como consecuencia de la incesante y prolífica investigación en relación a la actividad física y la salud, debido a la importancia que tiene el hecho de averiguar en profundidad las condiciones idóneas y más beneficiosas para la práctica del ejercicio físico como hábito de vida saludable con la finalidad de mejorar la calidad de vida de la población.

En este contexto, sería interesante poder repetir este trabajo pero ampliando el tamaño de la muestra con un mayor número de sujetos participantes para poder extraer conclusiones más generales.

No menos importante sería el modificar las condiciones en las que transcurrió la prueba de ejercicio físico en cuanto a duración, itinerario, temperatura...para poder extraer conclusiones sobre qué tipo de ejercicio físico resulta más adecuado y cómo debe realizarse, previniendo los efectos nocivos de una práctica deportiva realizada en condiciones adversas para la salud.

Otra línea de trabajo sería administrar los suplementos con una duración del tratamiento más amplia contrastando los resultados lo que podría dar informaciones interesantes. De cualquier manera, se podrían elegir otros suplementos y compararlos con los analizados en este trabajo.

Por último, el aporte de suplementos a la dieta, su repercusión y protección sobre la salud paliando o minimizando el estrés oxidativo inducido en el ejercicio físico intenso, como finalidad de este trabajo, podría tener efectos beneficiosos sobre las consecuencias negativas que dicho estrés oxidativo ocasiona en el organismo. Precisamente por ello, nuestro propósito con este estudio ha sido dar un paso más para intentar ayudar a avanzar en esta compleja pero interesante línea de investigación.

**BIBLIOGRAFÍA.**

1. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M, Muñoz-Hoyos A, Molina Carballo A, Arauzo M, Montes R, Vives F. (1995). Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res.* 19:57-63.
2. Acuña-Castroviejo D., Macías M., Crespo E., Aranzo M., León J., Martín M. et al. (1996). Potenciales efectos de la melatonina en el envejecimiento. *Rev Med Est* (en prensa).
3. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology* .150:121-127.
4. Akira S, Taga T, Kishimoto T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54: 1-78.
5. Albano C.B., Muralikrishnan D., Ebadi M. (2002). Distribution of coenzyme Q homologues in brain. *Neurochem Res.* May; 27(5):359-368.
6. American Medical Association. (1990). *Guides to the Evaluation of Permanent Impairment.* Chicago. AMA.
7. Ames B.N., Shigenaga M.K, Gold L.S. (1993). DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division:three key factors in mutagenesis and carcinogenesis .*Environ Health Perspect*,101 Suppl:5:35-44.
8. Ames B.N., Shinenaga M.K. (1993). Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:7915-7922.
9. Aniya, Y., Nieto, A. (1993). Oxidative stress induced activation of microsomal glutathione 5-transferase in isolated rat liver. *Biochemical Pharmacology* .45(1):37-42.
10. Anuona, O.L., Halliwell, B., Gajewski, E, Dizdaroglu, M.(1991).Cooper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presense of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*273:601-604.

11. Aquilo A, Tauler P., Fuentespina E., Tur J.A, Cordova A, Pons A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav.* Jan 31; 84(1):1-7. Epub 2004 Nov 10.
12. Asami S., Hirano T., Yamaguchi R., Tsurudome Y., Itoh H., Kasai H.(1998). Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 24; 243(3):678-82.
13. Aspray, T.J., Mugusi, F., Rashid, S. y col. (2000). Rural and urban differences in diabetes prevalence in Tanzania: the role of obesity, physical inactivity and urban living. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94, 637-644.
14. Astrand, P.O., Rodahl K. (2000). *Fisiología del trabajo físico.* Madrid: Ed Médica Panamericana, 1992.
15. Aw, T.Y, Andersson, B.S., Kennedy, F.G., Jones, D.P. (1996). Intracellular O<sub>2</sub> supply to support mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*143:707-716.
16. Babior B.M. (1984). The respiratory bursts of phagocytes. *J. Clin. Invest.* 73:599-601.
17. Balaban E, Cox J, Snell P, et al. (1989). The frequency of anemia and iron deficiency in the runner. *Med Sci Sports Exerc* 21:643-648.
18. Balcells A. (1993). *La clínica y el laboratorio.* Ed Masson 16ª Ed.
19. Beal FM. (1995). Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38 (3):357-66.
20. Bemelmans, M.H.A., Van Tits, L.J.H., Buurman, W.A. (1996). Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit. Rev. Immunol.*,16, 1-11.
21. Beyer RE. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as antioxidant. *Biochem Cell Biol.* 1992. Jun; 70(6):390-403.
22. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.*

- 12:64-76.
23. Borevis, A., Cadenas, E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. *FEBS Lett.*54:311-314.
  24. Borevis, A., Chance, B.(1983). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134:707-716.
  25. Bracci, R. (1992). Calcium Involvement in Free Radical Effects (editorial). *Calcif. Tissue Int.* 51:401-405.
  26. Breimer, L.H. (1990). Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of ADN base damage. *Mol. Carcinog.*3:188-197.
  27. Brenner, I.K.M., Natale, V.M., Vasiliou, P. y col. (1999). Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. *Eur. J. Appl. Physiol.*,80, 452-460.
  28. Brownstein, M., Saavedra, J.M., Axelrod, J. (1972). Control of pineal N-acetylserotonin by a beta-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 9:605.
  29. Brown G.C. (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Acta.* 1411:351-369.
  30. Bruunsgaard, H., Gslbo, H., Halkjaer-Kristensen, J. y col. (1997). Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J. Physiol. (London)*, 499, 833-841.
  31. Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. (1991). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In: *Handbook of Antioxidants.* Packer, L. and Cadenas, E. Eds. 1991 Marcel Dekker, Inc. New York. 91-115.
  32. Burton, G.W., Joyce, A., Ingoldy, K.U. (1982). First Proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet.*11:327-328.
  33. Cannon, JG. (1993). Exercise and resistance to infection. *J. Appl. Physiol.*74:

- 973-981.1993.
34. Casado A, López-Fernández ME. (2003). Age-correlated changes of the erythrocyte catalase activity in Spanish population. *Gerontology* 2003; 49 (4):251-254.
  35. Cascales, M. (1999). Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad. Instituto de España. Madrid.
  36. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B. (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrana fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest.* Oct; 33(10):924-30.
  37. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). *Physiol. Rev.*59:577-605.
  38. Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical Bulletin.* 49(3):481-493.
  39. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y.(2003).Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci* Apr 29; 100(9): 5119-23. Epub 2003 Apr 17.
  40. Ciurana R., Forés D., Martín Zurro A., Tizón J.L. (1994). Potocolo de actividades preventivas para la población adulta. *Protocolos FMC.*
  41. Cohen, M.C., Cohen, S. (1996). Cytokina function: a study in biologic diversity. *Am. J. Clin. Pathol.*, 105, 589-598.
  42. Conley K.E, Jubrians. S.A, Esselman P. (2000). Oxidative capacity and ageing in human muscle. *J. Physiol.* 526-203-210.
  43. Córdoba R, Ortega R, Cabezas C, Forés D, et al. (2001). Recomendaciones sobre el estilo de vida. *Atención primaria.* Vol 28. Suplemento 2.
  44. Córdoba A, Álvarez-Mon M.(2001). *La inmunidad en el deporte.* Madrid:

- Gymnos.
45. Córdova A. (2000). Fatiga muscular en el rendimiento deportivo. Editorial Síntesis, S.A.
  46. Coreil, J., Levin, J., Garty Jaco, E. (1992). Estilo de vida. Un concepto emergente en las ciencias sociomédicas. *Clínica y salud*. 3, 221-231.
  47. Correa R, Blanco B, Del Río M, Víctor V, Guayerbas N, Medina S, De la Fuente M. (1999). Effect of a diet supplemented with thioproline on murine macrophage function in a model of premature ageing. *Biofactors* 10, 195-200.
  48. Cranfor D.R, Davies K.J, (1996).Adaptative response and oxidative stress. *Environ Health Perspect*. 102:25-28.
  49. Czapski, G., Aronovitch, G., Samoni, A., et. al. (1983). The sensitization of the toxicity of superoxide and vitamin C by cooper and iron. A site specific mechanism. *Elsevier Biomedical* 1:111-118.
  50. Davies, K.J. (1995).Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* .61:1-31.
  51. De la Fuente M, Del Río M, Medina M. (2001). Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 116, 156-167.2001.
  52. De la Fuente M, Ferrández M.D, Burgos M.S, Soler A, Prieto A, Miquel J.(1998).Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can J Physiol Pharmacol*. 76, 373-387.
  53. De la Fuente M, Ferrández M.D, Del Río M, Burgos M.S, Miquel J.(1998). Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. *Mech Ageing Dev*.104, 213-25.
  54. De la Fuente M, Miquel J, Catalan M.P, Victor V.M, Guayerbas N. (2002). The amount of thiolic antioxidant ingestión hended to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. *Free Rad Res* 2002.36, 119-126.

55. De la Fuente M, Victor V.M. (2000). Antioxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol* 78, 49-54.2000.
56. De la Fuente M. (2002). La nutrición y el sistema inmunitario en el envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 37, 17-25.2002.
57. De la Fuente, M. (1998). Las defensas contra la infección, inmunidad y envejecimiento. En: El problema del envejecimiento (Barja, g.ed) Madrid Akal. pp 61-89.
58. De la Fuente, M. (2002) .Sistema inmunológico y deporte. *Selección* .11, 125-134.
59. De la Fuente, M. (2002). La nutrición y el sistema inmunitario en el envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 37, 17-25.2002.
60. De Paz J.A, Villa J.G., López P, González-Gallego J. (1995). Effects of long-distance running on serum bilirubin. *Med Sci Sports Exerc*. Dec; 27(12):1590-4.
61. De Teresa C, Alcalde A, Huertas J, Fresno M. (2003). Cycling performance and risks due to prolonged exercise training. Effects of *Phlebodium decumanum* (BK-4). En prensa.
62. De Vries, H.A. (1987). Tension reduction with exercise. En: Morgan, W.P. y Goldston, S.E. (Eds). *Exercise and mental health*. Washington, DC: Hemisphere. pp.99-104.
63. Del Castillo V, Julio (2003).Antioxidantes, radicales libres y ejercicio.Revista digital-Buenos Aires-año 5-Nº 23.
64. Díaz Martínez, Ángel E. (2005). Análisis clínicos. Módulo II. Laboratorio y deporte. Ed. Consejo general de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. pp.3-32.
65. Díaz, J., Sánchez, M.J., Navarro, A. (1998). Peroxidación lipídica en neonatología. *Pediátrica* 8(6):221-232.



66. Downing Jeg, Miyan J.A. (2000). Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol Today* 21, 281-289.
67. Drenth, J.P.H., Van Uun, S.H.M., Van Deuren. M. et al. (1995). Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates *ex vivo* TNF-alpha and IL-1beta production. *J. Appl. Physiol.*, 79, 1497-1503.
68. Dufaux, B., Order, U. (1989). Plasma elastase-alpha1-antitrypsin, neopterin, TNF, y soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *Int. J. Sport. Exerc.*, 10, 434-438.
69. Duran N., Farias Furtado S.T., Faljoni-Alario A., Campa A., Brunet J.E., Freer J.(1984). Singlet oxygen generation from the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of an activated CH<sub>2</sub> substrate. *J. Photochem.* 1984;25:285-289.
70. Erikssen G. (2001). Physical fitness and changes in mortality: the survival of the fittest. *Sports Med.* 31:571-576.
71. Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K. (1992). The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *J Nutr. Sci Vitaminol.* 548: 41-46.
72. Ernster L, Forsmark-Andree P. (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Investig.* 71(8 Suppl):60-65.
73. Escames, G., León, J., Khaldy, H., Bikjdaouene, L., Román, E., Galindo, R., Acuña D. (2002). Bioquímica pineal. En: Muñoz, A. Melatonina: Realidad actual y posibilidades futuras en Pediatría. Ed. Formación Alcalá, 73.
74. Esteban Fernández E. (2004). Efectos e influencia del aporte de *Phlebodium decumanum* y de un programa de acondicionamiento físico-salud, en sujetos no entrenados en condiciones fatigantes. Estudio-clínico experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

75. Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J.Clin.Nutr.*57(S) 779-786.
76. Eytan G.D., Matheson M.J, Racker E. (1976).Incorporation of mitochondrial membrane proteins into liposomes containing acidic phospholipids. *J Biol Chem*, 251(21):6831-7.
77. Fabris, N. (1991). Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to ageing. *Arch Gerontol Geriat* 12, 219-30.
78. Fallon K.E, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. (1999). The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med*. 1999 Aug; 33 (4): 264-9.
79. Fardy H, Silverman F. (1995). Localización celular y lugar específico de acción de cada antioxidante. *Arch. Dis. Child.*73:F112-117.
80. Fernández M.D., Maynar M, De la Fuente, M. (1996). Effect of a long-term training program of increasing intensity on the immune function of indoor Olympic cyclists. In *j Sports Med* 17, 592-596.
81. Fernández, M.D. (1994). Modificaciones en la respuesta inmune debidas al ejercicio físico. Tesis Doctoral. UAM.
82. Ferrández M.D, De la Fuente M. Changes with aging, sex and physical exercise in murine natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mech Ageing Dev.*1996.86, 83-94.
83. Ferrandez M.D., Correa R, Del Río M, De la Fuente M. (1999). Effects in vitro of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 34, 675-85.
84. Ferrández, M.D. y De la Fuente, M. (1995). Estado inmunológico de deportistas de alta competición. Adaptación Hormonal e Inmunológica al entrenamiento. Ministerio de Educación y Ciencia. Consejo Superior de Deportes, ICd. nº 2: 53-98.

85. Fitzgerald L. (1999). Exercise and the immune system. *Inmunol. Today*. 9; 337-339.
86. Flitter, W.D (1993). Free radical and myocardial reperfusion injury. *British Medical Bulletin* 49(3):545-555.
87. Foote, Ch.S. (1982). Light, oxygen and toxicity. In: *Pathology of oxygen*. Anne, P (eds) 1982. Academia Press. Londres. 21-44.
88. Fridovich, I. (1976). *Free radicals in Biology*. Ed. Pryor. Academic Press, 1976. New York. Vol 1; 239.
89. Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutase: An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264:7761-7764.2
90. Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical. Superoxide dismutases and related matters. *172:18515-18517*.
91. Friedl H.P., Smith D.J., Till G.D. (1990). Ischaemia reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Pathol.* 136:491-495.
92. Gannon, G.A., Rhind, D.G., Shek, P.N. y col. (2000). Inhibition of exercise-induced cytokine release by thermal clamping. *FASEB J.*, 14, A619.
93. Gilberto Ángel M., Mauricio Ángel R., Restrepo Elda, Camilo Uribe. (2006). *Interpretación clínica del laboratorio*. Ed médica panamericana. 7ª edición. p 109, 155
94. Gleeson M, Bishop N.C. (2002). Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: modification of immune responses to exercise by carbohydrate glutamina and anti-oxidant supplements. *Immunol Cell Biol.* 78:554-561.
95. Globerson, A., Effros, R.B. (2000). Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Inmunol Today* 21, 515-521.
96. González Jurado, J.A. (2003). Efectos del BK-4 sobre la fatiga muscular y el rendimiento físico deportivo en adultos jóvenes sometidos a un programa

- descondicionamiento físico general. Tesis Doctoral. Granada: Universidad de Granada.
97. Gracy R.W, Talent J.M, Kong, Conrad C.C. (1999). Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?. *Mutat Res* 428, 17-22.
  98. Greenwald, R.A., Moy, W.W. (1988). Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 23:455-463.
  99. Griendling K.K, FitzGeradl G.A. (2004). Oxidative stress and cardiovascular injury: basic mechanisms. Emory University Atlanta. *Circulation*:108:192.
  100. Guayerbas N, Catalan M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M.(2002). Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res* .134, 41-48.
  101. Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente, M. (2002). Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol.* 37:249-256.
  102. Gupta AK, Ross EA, Myers JN, Kashyap ML. (1993). Increased reverse cholesterol transport in athletes. *Metabolism.* Jun; 42(6):684-90.
  103. Guyton, K.Z., Kensler, T.W. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin.* 49(3):523-544.
  104. Halliwell B, Gutteridge J.M. (1995). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molec.Aspects med* 1985(8):189-193.
  105. Halliwell B, Gutteridge JM. (1999). Free radicals in biology and medicine. Third edition. New York: Oxford University Press.
  106. Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr.* 57(S):715S-722S.
  107. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E.(1992). Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Labo. Clin. Med.* 119(6):598-620.

108. Hanahan D.J and Ekholm J.E. (1974) The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods in Enzymology*. 31: 168-72.
109. Handelman, G.J. (1991). Carotenoids as scavenger of active oxigens species. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. and Cadenas, E. Eds. 1991 Marcel Dekker, Inc. New York. 259-313.
110. Harbor, V.J, Sutton, J.R.(1994). Endorphins and exercise *Sports Medicine*.35. pp 133-140.
111. Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, et al.(1995).On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation and scavenging of free radicals. *J Pineal Res*.18:104-14.
112. Hardeland, R., Poeggeler, B., Balzer, I., Behrmann, G. (1993). In: *Crhronobiology and chronomedicine*. Gutenbrunner, C.; Hildebrandt, G.; Moog, R. (eds). Peter Landg, Frankfurt, 113-120.
113. Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
114. Harman, D. (1986). Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging and disease process. En *Free Radicals, Aging and degenerative diseases* (Eds JE Johnson Jr, Walford R, Harman D, Miquel J. Alan R, Liss, New York. pp:3-49.
115. Hartfield, B.D. y Landers, D.M.(1997).Psychophysiology in exercise and sport research: an overview. *Exercise and Sport Sciences Reviews*.15.pp 351-387.
116. Hausladen A, Stambler,S. (1999).Nitrosative Stress.*Methods Enzymol*.300: 389-395.
117. Helge JW, Stallknecht B, Pedersen BK, Galbo H, Kiens B, Richter EA.(2003). The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in skeletal muscle. *J Physiol* 546:299-305.
118. Henle ES, Linn S.(1998).Formation, prevention and repair of DNA damage by Iron/Hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem*. 272(31):19095-19098.

119. Hernán Prat. (2003). Viscosidad sanguínea como factor de riesgo cardiovascular. Boletín del consejo argentino de H.T.A.nº 1.
120. Hernanz A, Collazos ME, De la Fuente M. (1990). Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophages from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch Allergy appl Immunol* 91,166-70.
121. Hiraishi, H., Terano, N., Ota, SL. (1998). Oxygen metabolite induced cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells. *Am. Jour. Physiol.* 367, 40-48.
122. Huertas J.R, Battino M, Lenaz G, Mataix J.(1991).Changes in mitochondrial and microsomal rat liver coenzyme Q9 and Q10 content induced by dietary fat and endogenous lipid peroxidation. *FEBS Letters*, 1,2,89-92.
123. Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi K, Okochi T. (1993). Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res.* Jul; 84(7):720-5.
124. Insua MF, Noviembre de (2003).Radicales libres, estrés oxidativo y ejercicio. *Revista digital-año 9-Nº 66.*
125. Internacional Comité for standarization in haematology. (1984).Recommendation for a selected method for the measurement of plasma viscosity. *L Clin Pathol* 37: 1147-1152.
126. Ji L. (1996). Exercise, oxidative stress and antioxidants. *Am J Sports Med* 24:20-24.
127. Jiang ZY, Woolard ACS and Wolff S.P. (1992). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 26: 853-856.
128. Johe P.D., Osterud B. (2005). The in vivo effect of melatonin on cellular activation processes in human blood during strenuous physical exercise. *J Pineal Res.* Oct; 39(3):324-30.

129. Junker R, Heinrich J, Ulbrich H, Schulte H, Shonfeld D.R, Kohler E.(1998). Relationship between plasma viscosity and the severity of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 870-75.
130. Kagan, V.E., Nohl, H., Quim, P.L. (1995). Coenzyme Q: Its role in scavenging and generation of radicals in membranes. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L and Cadenas, E. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 157-201.
131. Kagan, V.E., Serbinova, E.A., Koynova, E.A., Kitanova, S.A., Tyurin, V.A., Stoytchev, T.S., Quinn, P.J., Parcker, L. (1990). Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Rad Biol. Med.* 9:117-126.
132. Kaikkonen J, Kosonen L, Nyssonen K, Porkkala-Sarataho E, Salonen R, Korpela H, Salonen JT. (1998). Effect of combined coenzyme Q10 and d-alpha-tocopheryl acetate supplementation on exercise-induced lipid peroxidation and muscular damage: a placebo-controlled double-blind study in maratón runners. *Free Radic Res.* Jul; 29(1):85-92.
133. Kaikkonen J, Nyssonen K, Porkkala- Sarataho E, Poulsen HE, Metsa-Ketela T, Hayn M, Salonen R, Salonen JT.(1997). Effect of oral coenzyme Q10 supplementation on the oxidation resistance os human VLDL+LDL fraction:absorption and antioxidative properties of oil and granule-based preparations. *Free Radic Biol Med.* 22(7):1195-202.
134. Kaikkonen J, Tuomainen TP, Nyssonen K, Salonen JT. (2002). Coenzyme Q10: absortion, antioxidative properties, determinants and plasma levels. *Free Radic Res.* Apr; 36(4):389-397.
135. Kammuler, M.E. (1995). Recombinant human interleukin-6: safety issues of a pleiotropic growth factor. *Toxicology*, 105, 91-107.

136. Keats, D., Cameron, K., Morton, A.R. (1988). Exercise and the immune response. *Sports Medicine*, 5, 248-267.
137. Kensler T.W, Trush MA. (1983). Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ.Mol.Mutagen*.6:593-616.
138. Klatt P, Lamas S. (2000). Regulation of protein function by S- glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur.J.Biochem*.267:4928-4944.
139. Klotz L, Briviba K, Sies H. (2001). Signaling by Singlet Oxygen in Biological Systems. En: *Antioxidant and redox regulation of genes*. Ed: Sen C.K, cap 3, pp 47-49.
140. Kluth, DC., Rees, AJ. (1996). Inhibiting inflammatory cytokines. *Semin. Nephrol.*, 16 (6), 576-582.
141. Knight, J.A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants and immune system. *Ann Clin Lab Sci* 30, 145-158.
142. Kratz A, Lewandrowski KB, Siegel AJ, Chun KY, Flood JG, Van Cott EM, Lee-Lewandrowski E. (2002). Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. *Am J Clin Pathol* 118 (6): 856-63.
143. Kukreja, R.C., Konotos, H.A., Hess, M.L., Ellis, F.F. (1986). PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.* 59:612-619.
144. Landi L, Fiorentini D, Stefanelli C, Pasquali P, Pedulli G.F. (1990). Inhibition of autoxidation of egg yolk phosphatidylcholine in homogenous solution and in liposomes by oxidized ubiquinone. *Biochem. Biophys. Acta.* 1028: 223-228.
145. Laperriere, A. y col. (1994). Exercise and psychoneuroimmunology. *Medicine sciences sports and exercise.* 26, 182-190.
146. Leeuwenburgh C, Heinecke J. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 8:829-838.



147. Lemer A.B, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mod N. (1958). Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 80:2587.
148. Leveille S.G, Gray S, LaCroix A.Z, et al.(2000).Physical inactivity and smoking increase risk for serious infections in older women. *J Am Geriatr Soc.* 48:1582-1588.
149. Liebler, D.C. (1993). The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit. Rev. Toxicol.* 23:147-169.
150. Lim S, Kim S.K, Park K.S. et al. (2000). Effect of exercise on the mitochondrial AND content of peripheral blood in healthy women. *Eur J Appl Physiol.*82:407-412.
151. Lind C, Hochstein, P., Ernester L. (1982). In: oxidase and other redox enzymes. King T.E., Mason, H.S., Morrison, M (eds). Pergamon Press. Oxford.
152. Litarru G.P. (1994). Energy and defense. Facts and perspective on coenzyme Q10 in biology and medicine. Casa Editrice Scientifica Internazionali. Roma.
153. Lodovici M, Casalini C, Cariaggi R, Michelucci L, Dolara P. (2000). Levels of 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. *Free Radic Biol Med.* Jan 1; 28 (1): 13-7.
154. Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE.(1993). 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Environ Health.* Oct-Nov; 40(2-3):391-404.
155. López L.M, Lucía A. (2002). Bases conceptuales de la actividad física en relación con la salud. En: López LM. *Actividad física y salud. Para ejecutivos y profesionales.* Madrid: CIE Dossat 2000; p.33-36.
156. López LM. (2002). La necesidad de realizar ejercicio físico. Efectos del sedentarismo. En: López LM. *Actividad y salud. Para ejecutivos y profesionales.* Madrid: CIE Dossat.p.13-32.

157. Lord, JM., Butcher, S., Killampali, V., Lascelles, D., Salmon, M. (2001). Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Develop* 122, 1521-1535.
158. Lowe G.D., Lee A, Rumley A, Price JF, Fowkes FG. (1997). Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the edinburgh artery study. *Br J Haematol* 96:168-73.
159. Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, *et al.* (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-75.
160. Lunec, J. (1992). Free radicals: their involvement in disease processes. *Biochim.Ciln.* 16(2):99-108.
161. Makinodan, T, Kay, M. (1980). Age influence on the immune system. *Avd Inmunol* 29, 287-331.
162. Marcos Becerro JF, Galiano Orea D. (2004). Ejercicio, Salud y Longevidad. Consejería de turismo y deporte. (Junta de Andalucía).pp188.
163. Marcos Becerro, J.F. y De la Fuente, M. (2000). “Utilidad del entrenamiento general y el de fuerza para mejorar el sistema inmunitario”. En *Entrenamiento de Fuerza para todos.* IWF. 611-643.
164. Mark, SN. (1994). Exercise and immunology. *Med. Sc. Sport. Exerc.*,26, 125-127.
165. Marsh SA, Laursen PB, Coombes JS.(2006). Effects of antioxidant supplementation and exercise training on erythrocyte antioxidant enzymes. *Int J Vitam Nutr Res.* Sep; 76(5):324-31.
166. Mastaloudis, A., *et al.* (2001). Estrés oxidativo en atletas cuando realizan ejercicios extenuantes. Linus Pauling Institute and Oregon State University, Corvallis, Oregon. *Free Radic Biol Med.* 31:911-922.
167. Mataix Albert, B. (2005). Efecto de los ácidos grasos de la dieta y la suplementación con coenzima Q<sub>10</sub> sobre el estrés oxidativo cerebral durante el envejecimiento. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Editorial de la

Universidad de Granada.

168. Mataix J, Quiles J.L, Huertas J.R, Battino M, Mañas M. (1998). Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 24(4):511-521.
169. Mataix, J., Mañas, M., Quiles, J. et al. (1997). Coenzyme Q content depends upon oxidative stress and dietary fat unsaturation. *Mol. Aspects. Med.* 18:129S-135S.
170. Matuszak, Z., Reszka, K.J., Chignell, C.F. (1997). Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radical Biology and Medicine.* 23(3):367-372.
171. Maya, A, Del Río, M, Fernández, M.D. De la Fuente, M. (1998). Cambios en la respuesta inmune por el estrés asociado al ejercicio físico. Ministerio de Educación y Ciencia. Consejo Superior de Deportes ICd. 18:65-97.1998.
172. Mazzeo, RS. (1994). The influence of exercise and aging on immune function. *Medicine science sports and exercise.* 26, 586-692.
173. McAnulty S.R, McAnulty L, Pascoe D.D., Gropper S.S., Keith R.E., Morrow J.D., Gladden L.B. (2005). Hyperthermia increases exercise-induced oxidative stress. *Int J Sports Med.* Apr; 26(3):188-92.
174. McCord, J.M. (1989). Free radical and heart disease. In: Somogy, J.C.; Muller, H.R. Eds. *Nutritional Impact of Food Processing.* Bibli. Nutr. Dieta. Basel. Karger. 43:327-337.
175. Medina S, Del Río M, Ferrandez MD, Hernanz A, De la Fuente (1998). M. Changes with age in the modulation of natural killer activity of murine leukocytes by gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y and sulfated cholecystinin octapeptide. *Neuropeptides* 32, 549-55.
176. Medveded, Z. (1990). An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev.* 65:375-98.

177. Melchiorri D, Reiter R.J, Attia A.M, Hara M, Burgos A, Nitisco G. (1994). Potent protective effect of melatonin in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci* 56:83.
178. Mellors A, Tappel, A.L. (1966). Quinones and quinola as inhibitors of lipid peroxidation. *Lipids*. 1: 282-284.
179. Melov S. (2002). Regulation of glutation synthesis. *Curr.Top.Cell Regull*.36:95-116.
180. Mendoza, R., Sagrera, M., Batista, JM. (1994). Conductas de los escolares españoles relacionadas con la salud (1986-1990). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
181. Meydani S.N, Erickson, K.L (2001). Nutrients as regulators of immune function: Introduction. *Faseb J* 15, 2555-2565.
182. Minotti, G., Aust, D. (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*. 1987; 44:191-208.
183. Miquel J, Economos A.C. (1979). Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 14, 279-85.
184. Miquel, J. (1989). Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. In: *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. Miquel, J., Quintanilha, A.T., Weber, H. (eds). Boca Raton, Florida. CRC press. 1:3-13.
185. Miquel, J. (1998). An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33,113-26.
186. Miquel, J. Economos A.C, Fleming J, Johnson J.E. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15: 575-591.
187. Mohr D, Bowry VW, Stocker R.(1992). Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating

- lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation. *Biochem Biophys Acta*. Jun 26; 1126(3):247-54.
188. Moldeveanu, A.I., Shephar, R.J., Shek, P.N. (2000). Prolonged exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in circulating mononuclear cells.. *Appl. Physiol.*, 89, 1499-1504.
189. Moldoveanu AI, Shephard R.J, Shek P.N.(2001). The cytokine response to physical activity and training. *Sport Med.* 31(2):115-144.
190. Moldoveanu, AI., Shephard, R.J., Shek, P.N. (2001). The cytokine response to physical activity and training. *Sport medicine*, 31(2), 115-144.
191. Molina, A. Muñoz, A., Uberos, J., Contreras, F. (2002). Patología por radicales libres en Pediatría. En: Muñoz, A. Melatonina: Realidad actual y posibilidades futuras en Pediatría. Ed. Formación Alcalá, 626.
192. Molina, E. (2002). Efectos del *Phlebodium decumanum* sobre el daño oxidativo y la disfunción inmune provocados por el ejercicio físico extenuante. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
193. Monte, M.; Sacerdote de Lusting, E.(1994). Radicales libres del oxígeno y superóxido dismutasas: Aspectos biológicos y médicos. *Medicina (Buenos Aires)* .54:61-68.
194. Moore RY. (1978). The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog Reprod Biol.* 4:1-29.
195. Muggli, R. (1993). Free radical tissue damage: the protective role of antioxidants nutrients. In: Free radicals and antioxidants in nutrition. pp189-204. Richelieu Press. London. U.K.
196. Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S., Nagaoka, S. (1993). Kinetic study of free radical scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of

- ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. *Biochim. Biophys. Acta.* 1157:313-317.
197. Muñoz-Hoyos A, Hubber E, Escames G, Molina-Carballo A, Macías M, Valenzuela-Ruiz A, Fernández-García JM, Acuña- Castroviejo D. Effect of propranolol plus exercise on melatonin and growth hormone levels in children with growth delay. *J Pineal Res.* 2001 Mar; 30(2):75-81.
198. Muñoz-Hoyos, A., Rodríguez, T., Molina, A., García, J.; Escames, G., Martín, M. (2002). Regulación de la síntesis de melatonina. En: Muñoz, A. Melatonina: Realidad actual y posibilidades futuras en Pediatría. Ed. Formación Alcalá. pp 93-94.
199. Nassi-Caló, L., Mello-Filho, A.C., Meneghini, R. (1989). O-phenanthroline protects mammalian cells from hydrogen peroxide-induced gene mutation and morphological transformation. *Carcinogenesis* .10:1055-1057.
200. Navas F.J, Jiménez F.(1999). Valoración médica inicial y continuada del deportista sano. El ejercicio en patología cardiovascular, pulmonar, diabetes mellitus y otras enfermedades limitantes. *Medicine 7ª serie* nº 127. Julio.
201. Nevado Jiménez, A. (2001). Valoración del papel antioxidante de la melatonina frente a la intoxicación por adriamicina. Estudio a nivel de hepatocito y eritrocito en ratas wistar (tesis doctoral). 3-91.
202. Nieman, D.C. (1997). Immune response to heavy exertion. *J. Appl. Physiol.*, 82(5), 1385-1394.
203. Nieman, D.C., Nehlsen-Cannarella, S.L., Fagoaga, O.R. y col. (1998). Influence of mode and carbohydrate on the cytokine response to heavy exertion. *Med. Sc. Sport. Exerc.*, 30, 671-678.
204. Niess A.M.(2003). Evaluation of stress responses to interval training at low and moderated altitudes. *Med Sci Sport Exerc.* J35 (2):263-269.

205. Nieto, N. (1993). Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memoria de licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia.
206. Noble, J.J., Borg, GAV., Cafarelli, E. y col. (1997). Symposium on recent advances in the study and clinical use of perceived exertion. *Medicine and science*. 14, 376-411.
207. O' Toole M, Hiller W, Roalstad M, et al. (1998). Hemolysis during triathlon races: its relation to race distance. *Med Sci Sports Exerc* 20:272-275.
208. Ochoa J.J, Huertas J.R, Quiles J.L, Olvera A.B, Mataix J.(2000).Relative importance of the saponified and unsaponified fractions of dietary olive oil on the mitochondrial lipid peroxidation in rabbit heart.*Nutr.Metab.Card.Dis*,9:284-288.
209. Orhan H, van Holland B, Krab B, Moeken J, Vermeulen NP, Hollander P, Meerman JH. (2004). Evaluation of a multi-parameter biomarker set of oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radic Res*. Dec; 38(12):1269-79.
210. Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G., Nicotera, P. (1989). Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends. Pharmacol. Sci*.10:281-285.
211. Ortega E, García J.J, De la Fuente, M. (2000). Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 85.5, 519-525.
212. Ortega E. (1991). Estudio comparado del efecto de la actividad física en células fagocíticas, poblaciones celulares y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Influencia de la edad. Tesis Doctoral. UNEX.

213. Ortega R, Mainka J. (1996). Criterios para la valoración del paciente que realizará ejercicio físico. FMC. Vol. 3 nº 8. Octubre.
214. Ostrowski, K. Rohde, T., Asp, S. y col. (1999). The cytokine response and strenuous exercise: TNF-alpha, IL-2, IL-1ra, sTNF-r1, sTNF-r2 and IL-10. J. Physiol. (London), 515, 287-291.
215. Ostrowski, K. Rohde, T., Zacho, M. (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. Journ. Physiol. 508, 949-953.
216. Pahlavani M.A. (2000). Caloric restriction and immunosenescence: a current perspective. Front Biosci 5, D580-587.
217. Palombo, J.D., Blackburn, G.L., Forse, R.A. (1991). Endothelial cell factors and response to injury. Surgery. 173. 505-519.
218. Paraidathalu, T., de Grot, H., Kehrer, J.P. (1992). Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. Free Rad. Biol. Med. 13:289-298.
219. Pawelek G, Effros C, Caruso C, Remarque E, Barnett y Solana R. (1999). T cells and aging. Front Biosci 4, 216-69.
220. Payan, D.G., McGillis J.P., Goetz E.J. (1986). Neuroimmunology. Advance immunology. 39, 299-323.
221. Peake J, Wilson G, Hordern M, et al. (2004). Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation and respiratory burst activity after moderate and high intensity exercise. J Appl Physiol. 97:612-618.
222. Peake J.M., Suzuki K., Coombes J.S. (2006). The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise. J Nutr Biochem. Dec 5.
223. Pedersen B.K, Carafoli E. (1987). Ion motive ATPases. Ubiquity, properties and significance to cell function. Trends Biochem. 56:182-186.



224. Pedersen B.K, Hoffman-Goetz L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol. Rev.* 80:1055-1081.
225. Pedersen B.K, Steensberg A.(2002). Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and interleukin-6 shared mechanisms? *Med Sci Sports Exer.* 34(12):2004-2013.
226. Pedersen B.K, Toft A.D.(2000). Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med.* 34: 246-251.
227. Pedersen B.K. (1991). Influence of physical activity on the cellular immune system: mechanisms of action. *Int J Sports Med.* 12:23-29.
228. Pedersen, BK., Ostrowski, K., Rohde, T. (1998). The cytokine response to strenuous exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 505-511.
229. Petibois C, Deleris G. (2004). Oxidative stress effects on erythrocytes determined by FT-IR spectrometry. *Analyst.* Oct; 129(10):912-6. Epub 2004 Aug 19.
230. Petibois C, Deleris G. (2005). Erythrocyte adaptation to oxidative stress in endurance training. *Arch Med Res.* Sep-Oct; 36(5):524-31.
231. Petibois C, Deleris G. (2005). Evidence that erythrocytes are highly susceptible to exercise oxidative stress: FT-IR spectrometric studies at the molecular level. *Cell Biol Int.* Aug; 29(8):709-16.
232. Pfeiffer J.M, Askew E.W, Roberts D.E, Word S.M, Benson J.E, Jonson S.C, Freedman M.S.(1999). Effect of antioxidant supplementation on urine and blood markers of oxidative stress during extended moderate-altitude training. *Wilderness Environ Med.* Summer; 10(2):66-74.
233. Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., Marcheselli, F. (1994). Melatonin: A peroxil radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci.* 55:271-276.
234. Pierrefiche G, Laborit H. (1995). Oxygen free radicals, melatonin and aging.

- Exptl .Gerorontol. 30:213.
235. Pilger A, Germadnik D, Formanek D, Zwick H, Winkler N, Rudiger HW.(1997). Habitual long-distance running does not enhance urinary excretion of 8-hidroxydeoxyguanosine. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 75(5):467-9.
236. Pi-Sunyer. Fx. (1999).Comorbidities of overweight and obesity: current evidence and research issues. Med. Sci. Sports. Exerc.31. Suppl. S602-S608.
237. Poeggeler B, Balzerl, Hardeland R, Lerch A. (1991). Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax poiyedra*: Naturwissenschaften. 78:268-269.
238. Porter, N.A. (1990). Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: Initiation, propagation and product distribution (basic chemistry). In: Membrane lipids oxidation. Vigo-Pelfrey, C (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida I:33-62.
239. Powers S.K, Hamilton K. (1999). Antioxidants and exercise. Clin Sports Med. Jul; 18(3):525-36.
240. Prieto, A., Reyes, E. Álvarez-mon, M. (1997). Activación de las subpoblaciones de linfocitos a sus funciones efectoras. Medicine. 51, 2263-2267.
241. Prieto, A., Reyes, E. Álvarez-mon, M. (1997). Tolerancia y autoinmunidad. Medicine. 51. 2303-2308.
242. Puerto M, Guayerbas N, Víctor V.M, De la Fuente M. (2002). Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a Mouse model of premature ageing. Pharmacol Biochem Behav. 73, 797-804.
243. Punzón C, Alcaide A, Fresno M. (2001).Modulation of TNF receptors by *Phlebodium decumanum*. J. Ethnopharmacolog. En prensa. 2001.

244. Punzón C, Alcaide A, Fresno M. (2003). In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. *International Immunopharmacology* 3(9):1293-1299.
245. Quiles J.L, Huertas J.R, Mañas M, Ochoa J.J, Battino M, Mataix J.(1999).Oxidative stress induced by exercise and dietary fat modulates the coenzyme Q and vitamin a balance between plasma and mitochondria.*Int.J.Vitam.Nutr.Res*,69(4):243-249.
246. Ramon, J.R.(1993). Protocolos: Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. Editorial IDEPSA.
247. Reighlin, S. (1993). Neuroendocrine – immune interactions. *New english journal medicine*. 329, 1246-1253.
248. Reiter R.J, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang GG, Ortiz G, Acuña-Castroviejo D.(1995). A review of the evidence supporting melatonin as antioxidant. *J Pineal Res*.18:1-11.
249. Reiter R.J, Tan D.X, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol*. 50(4):1129-46.
250. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*. 7(6):444-58.
251. Reiter, R.J., Guerrero, J.M., García, J.J., Acuña-Castroviejo, D. (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Biochem. Pharmacol*. 56(10):1265-1272.
252. Reppert S.M, Weaver D.R. (1995). Melatonin madness. *Cell* 83:1059-1062.
253. Rhind, S.G., Shec, P.N., Shephard, R.J. (1995). The impact of exercise on cytokines and receptor expression. *Exerc. Immunol. Rev.*, 1, 97-148.

254. Richter, C., Park, J.W., Arnes, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:6465-6467.
255. Ritcher C, Park JW, Ames BN (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natt Acad Sci. USA,* 85(17):6465.
256. Rivier, A., Pene, J., Chanez, P. y col. (1994). Release of cytokines by blood monocytes during strenuous exercise. *Int. J. Sport. Med.* 15, 192-8.
257. Roche, E.; Romero-Alvira, D. (1996). Alteraciones del DNA inducidas por el estrés oxidativo. *Med. Clin.* 106:144-153.
258. Roitt, I, Brostoff .J, Male. D. *Inmunología.* Ed Harcourt. 5ª edición. 2005. pp 121-122.; 137.
259. Rokitzki, L., Logemann, E. Hubber, G. y col. (1994). Alpha-tocopherol supplementation in racing cyclists during extreme endurance training. *Int. Journ. Sport Nutr. Sep.* 4(3), 253-264.
260. Roy R.S, McCord J.M. (2003). Superoxide and ischaemia: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In: *Oxy radicals and their scavenger systems, Vol II.* Greenwald and Cohen (eds) 145-153.
261. Ruth, JH., Bienkowski, M., Warmington, KS. y col. (1996). IL-1ra expression, function, and cytoline-mediated regulation during mycobacterial and achistosoma antigen-elicited granuloma formation. *J. Immunol.,* 156, 2503-2509.
262. Ryrfeldt, A., Bammenberg, G., Moldius, P.(1993). Free radical and lung disease. *British Medical Bulletin* 49(3):588-603.
263. Saez M del C, Barriga C, García JJ, Rodríguez AB, Ortega E. (2007). Exercise-induced stress enhances mammary tumor growth in rats: beneficial effect of the

- hormona melatonin. *Mol Cell Biochem.* Jan; 294(1-2):19-24. Epub 2006 Nov 29.
264. Salit M. (2003). Exercise and immunity. En: Thomas .Drugs, athletes and physical performance. pp: 169. Plenum Medical Book Company. New York and London Plenum. Publishing Corporation.
265. Salleras L, Serra L.(1991). Actividad física y salud. En: Medicina preventiva y salud pública. 9ª edición. Barcelona: Masson-Salvat Medicina.
266. Sastre J, Pallard, Fv, García de la Asunción, J, Viña, J (2000). Mitochondra, oxidative stress and aging. *Free Rad Res* 32, 189-98.
267. Scaiano, J.C. (1995). Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions and magnetic field effects in melatonin chemistry. *J. Pineal. Res.*19:189-195.
268. Seidell J.C. Visscher.TL., Hoogeveen, RT.(1999).Overweight and obesity in the mortality rate data: current evidence and research issues. *Med. Sci. Sports. Exerc.*31. Suppl. S597-S601.
269. Sen C.K. (2001).Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med.* 31:891-908.
270. Serra Grima, Ricard, Bagur Calafat Caritat. (2004). Prescripción de ejercicio físico para la salud. Ed. Paidotribo.
271. Sevanian, A, Hochstein, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.* 5:365-390.
272. Shephard, R. (1995). Physical activity fitness and health: the current consensus. *Quest.* 47 (3), 288-303.
273. Sies, H. (1996). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemi* 25, 1058-71.
274. Sigal, L.H., Ron, Y. (1994). Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences. New York: McGraw Hill.
275. Smith J, Kolbuch-Braddon M, Gillam I, et al. (1995). Changes in the

- susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise. *Eur J Appl Occup Physiol* 70: 427-436.
276. Smith J. (1995). Exercise, training and RCB turnover. *Sports Med* 19: 9-31.
277. Smith L.L.(2000). Cytokine hipotesis of overtraining: a physiological adaptation to excesive stress?. *Med Sci Sports Exerc* 32(2):317-331.
278. Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. (1998). Guía de actuación en Atención Primaria.
279. Sohal R.S, Sohal B.H, Brunk U.T. (1990). Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech Ag Dev* 1990; 53:217-27.
280. Sohal R.S, Allen R.G. (1990). Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging; a unifying hypothesis. *Exp Ger.* 25:499-522.
281. Stearns S.C, Bernard S.L, Fasick S.B et al. (2001). The economic implications of self-care: the effect of lifestyle, functional adaptations and medical self-care among a national sample of Medicare beneficiaries. *Am J Public Health*.90:1608-1612.
282. Steensberg A, Febbraio M.A, Osada T, Schjerling P, Van Hall G, Saltin B, Pedersen BK.(2001). Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol* 537:633-639.
283. Stryer L. (1995). *Bioquímica*. 4ª ed. Editorial reverté.
284. Stubbe, J. (1990). Ribonucleotide reductase; amazing and confusing. *J.Biol.Chem.* 265:5329-5332.
285. Subudhi A.W, Jacobs K.A, Hagobian T.A, Fattor J.A, Fulco C.S, Muza S.R, Rock P.B, Hoffman A.R, Cymerman A, Friedlander AL.(2004). Antioxidant supplementation does not attenuate oxidative stress at high altitude. *Aviat Space Environ Med.* Oct; 75(10):881-8.

286. Sureda A, Tauler P, Aquilo A, Cases N, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, Pons A. (2005). Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic Res. Dec*; 39(12):1317-24.
287. Suzuki, K., Yamada, M., Kurakake, S. Y col. (2000). Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 81, 281-287.
288. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?. *J Pineal Res.* 2007 Jan; 42(1):28-42.
289. Tan, D.X., Poeggeler, B., Reiter, R.J., Chen, S., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L.R. (1993). The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 70:65-71.
290. Tesoriere L, D'Arpa D, Conti S, Giaccone V, Pintaudi AM, Livrea MA. (1999). Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: new insights into the radical-scavenging activity. *J Pineal Res.* Sept; 27(2):95-105.
291. Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., Gregolin, C. (1982). Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation. *Biochem. Biophys. Acta.* 710:197-211.
292. Urso M.L, Clarkson P.M.(2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* Jul 15; 189(1-2):41-54.

293. Vassilakopoulos T, Karatza M.H., Katsaounou P, Kollintza A, Zakyntinos S, Roussos C. (2003). Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J Appl Physiol Mar*; 94(3):1025-32. Epub 2002 Nov 27.
294. Victor VM, Guayerbas N, Garrote D, Del Río M, De la Fuente M. (1999). Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock. *Biofactors* 10, 347-357.
295. Victor, VM, De la Fuente, M. (2002). N-acetylcysteine improves in Vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radical Res* 36, 33-45.
296. Vijayalaxmi, Reiter R.J, Meltz M.L. (1995). Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutat Res* 346:23.
297. Vincent H.K, Bourguignon C.M, Vincent K.R, Weltman A.L, Bryant M, Taylor A.G. (2006). Antioxidant supplementation lowers exercise-induced oxidative stress in young overweight adults. *Obesity (Silver Spring) Dec*; 14(12):2224-35.
298. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzler E, Gisinger B, Waldhauser M, Schemper M et al.(1998). Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinal Metab* 66:648-652.
299. Walford R.L. (1997). MHC regulation of aging: an extension of the immunologic theory of aging. En *Modern Biological Theories of Aging*. Warner HR, Butler RN, Sprott RL, Schneider EL eds. pp 243-260. Raven Press New York.
300. Wallace K.B, Johnson J.A. (1987). Oxygen-dependent effect of microsomes on the binding of deoxorubicin to rat hepatic nuclear DNA. *Mol Pharmacol*, 31(3):307-11.



301. Warholm, M., Cuthenberg, C., Von Barh, C., Mannervick, B. (1985). Glutathione transferases from human liver. *Methods in enzymology* .113:499-504.
302. Watson TA, MacDonald\_Wicks LK, Garg ML. (2005). Oxidative stress and antioxidants in athletes undertaking regular exercise training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* Apr; 15(2):131-46.
303. Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS (1990). Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol* 45, M45-48.
304. Wei YH. (1998). Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med.*217:53-63.
305. Weiss S. (1982). Neutrophil-mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. *J Biol Chem.* 257: 2947-2953.
306. Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J., Blake, D.R. (1993). Free radical in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin* .49(3):507-522.
307. Wolf, S.P. (1993). Diabetes Mellitus and free radicals. *British Medical Bulletin.* 49(3):642-652.
308. Wu H.J., Chen K.T., Shee B.W., Chang H.C., Huang Y.J., Yang R.S. (2004). Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J Gastroenterol* Sep 15; 10(8):2711-4.

## ANEXOS.

### **HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Y COMPROMISO.**

Yo, D. \_\_\_\_\_  
con D.N.I. \_\_\_\_\_ consiento que se me administre de forma voluntaria el  
producto \_\_\_\_\_ antes de la prueba atlética que voy a realizar de subida a  
Sierra Nevada en el día \_\_\_\_\_, habiendo sido informado previamente de las  
características y uso ya contrastado exento de complicaciones del producto reseñado.  
De igual manera me comprometo a proporcionar la información oportuna que se me  
pida sin ocultar o falsear los datos para llevar a cabo el proyecto de investigación.

Firma:

Fdo: \_\_\_\_\_.

En Granada, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_.

**FICHA PERSONAL** \_\_\_\_\_ **Fecha:** \_\_\_\_\_.

**Nombre:** \_\_\_\_\_

**Apellidos:** \_\_\_\_\_

**Fecha de nacimiento:** \_\_\_\_\_ **Edad:** \_\_\_\_\_

**Lugar de residencia habitual:** \_\_\_\_\_

**Teléfono.** \_\_\_\_\_ ; **Ocupación:** \_\_\_\_\_

1. ¿Cómo considera que es actualmente su estado de forma física? \_\_\_\_\_
2. ¿Hace ejercicio de forma habitual? \_\_\_\_\_
3. ¿Con qué frecuencia? \_\_\_\_\_
4. ¿Cuánto tiempo aproximado por sesión? \_\_\_\_\_
5. ¿Padece actualmente alguna lesión? \_\_\_\_\_ ¿cuál? \_\_\_\_\_
6. ¿Ha tenido anteriormente alguna lesión? \_\_\_\_\_ ¿cuál? \_\_\_\_\_
7. ¿Padece alguna enfermedad? \_\_\_\_\_ ¿cuál? \_\_\_\_\_
8. ¿Está tomando alguna medicación? \_\_\_\_\_ ¿cuál? \_\_\_\_\_
9. ¿Sigue alguna dieta estricta? \_\_\_\_\_
10. ¿Es fumador habitual? \_\_\_\_\_
11. ¿Es bebedor habitual? \_\_\_\_\_

**OBSERVACIONES:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Firmado:**

\_\_\_\_\_

**FICHA CONTROL.****Nombre:****Apellidos:****OBSERVACIONES GENERALES:**

Detalla si has tenido alguna enfermedad durante el tiempo previo a la prueba de ejercicio físico, si has tomado algún medicamento o si has sufrido algún tipo de lesión física que pueda repercutir.

---



---



---



---

**1. SUPLEMENTACIÓN.**

	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO (DÍA DE LA PRUEBA).
Desayuno			
Almuerzo			
Cena			

Marca los días y las tomas en las que has tomado correctamente el suplemento.

**OBSERVACIONES:**


---



---



---

## **2. DIETA HABITUAL.**

Señala los días previos a la prueba en los que has tenido cambios bruscos en tu dieta habitual, ya sea por exceso o por defecto. Señala los días y resume las variaciones y sus causas.

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

## **3. EJERCICIO FÍSICO.**

Señala los días previos a la prueba en los que has realizado más ejercicio físico del habitual para ti y el tiempo aproximado.

---

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

- Figura I.1. Reacción de Fenton. ....60
- Figura I.2. Lugar específico de acción de cada antioxidante.....74
- Figura I.3.Estructura química de la 5-metoxi-N- acetil-triptamina o melatonina... ..85
- Figura I.4. Estructura química de la Ubiquinona o Coenzima Q<sub>10</sub>.....89
- Figura I.5. Mecanismos antioxidantes del Coenzima Q<sub>10</sub>. ....92
- Figura II.1. Curva de regresión sigmoidea para la cuantificación de la melatonina. ....143

**ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS E ILUSTRACIONES.**

- Fotografía I.1. Imágenes de ejemplares de la especie *Phlebodium decumanum*.....97
- Ilustración I.1. Especies reactivas .....55
- Ilustración I.2.Diferencias morfológicas de los frondes de los dos subgéneros de *Phlebodium*.....98
- Fotografía II.2. Un grupo de participantes en la carrera hacia Sierra Nevada.....110
- Ilustración II.1. Itinerario por el que transcurre la prueba.....111

**INDICE DE GRÁFICOS.**

- Gráfico II.1. Cambios de pendiente del itinerario.....112
- Gráfico II.2. Altitud de los distintos tramos de la carrera.....112
- Gráfico III.1.Concentración plasmática de bilirrubina total en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....150

- Gráfico III.2. Concentración plasmática de colesterol total en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio .....153
- Gráfico III.3 Concentración plasmática de fosfolípidos en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio .....155
- Gráfico III.4. Concentración plasmática de triglicéridos en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....156
- Gráfico III.5. Concentración plasmática de proteínas totales en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....160
- Gráfico III.6. Concentración plasmática de Interleukina-6 en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....162
- Gráfico III.7. Concentración plasmática de TNF- $\alpha$  en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....164
- Gráfico III.8. Concentración plasmática del receptor antagonista de la interleukina-1 en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....166
- Gráfico III.9. Concentración plasmática del receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....169
- Gráfico III.10. Viscosidad plasmática en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....172
- Gráfico III.11. Concentración plasmática de melatonina en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....173
- Gráfico III.12. Capacidad antioxidativa en plasma en los distintos grupos al inicio y al final del ejercicio. ....177
- Gráfico III.13. Concentración de proteínas de citosol de eritrocitos en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....180
- Gráfico III.14. Concentración de proteínas en membrana de eritrocito en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio. ....182

- Gráfico III.15. Concentración de hemoglobina en citosol de eritrocito en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio.....184
- Gráfico III.16. Concentración de hidroperóxidos en membrana de eritrocito basales en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio.....186
- Gráfico III.17. Concentración de hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio.....187
- Gráfico III.18. Concentración de 8-hidroxiguanosina en orina en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio.....190
- Gráfico III.19. Concentración de creatinina en orina en los distintos grupos al inicio y final del ejercicio.....192

### **ÍNDICE DE TABLAS.**

- ✓ Tabla I.1.Ventajas del ejercicio físico sobre la salud mental.....30
- ✓ Tabla I.2.Cambios del adulto-joven al mayor en diferentes funciones de las células inmunitarias. Papel del ejercicio físico moderado.....38
- ✓ Tabla I.3.Cambios del adulto joven al mayor en las diferentes funciones de las células inmunitarias.....42
- ✓ Tabla I.4.Cambios del adulto-joven al mayor en diferentes funciones de las células inmunitarias. Papel de la ingestión de antioxidantes.....47
- ✓ Tabla I.5.Fuentes de estrés oxidativo en Fisiopatología humana.....52
- ✓ Tabla I.6.Factores que intervienen en el balance oxidativo celular.....53
- ✓ Tabla I.7.Vida media y blanco biológico típico de los radicales libres y especies reactivas del oxígeno.....54
- ✓ Tabla I.8.Ejemplos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno.....56



✓ Tabla I.9. Algunos de los productos secundarios de la peroxidación de los lípidos.....	69
✓ Tabla I.10. Repercusión fisiopatológica del estrés oxidativo mediante los radicales libres en distintos órganos o sistemas del cuerpo y ejemplos de las alteraciones ocasionadas.....	72
✓ Tabla I.11. Antioxidantes naturales y sintéticos de uso terapéutico (Maxwell)..	74
✓ Tabla I.12. Antioxidantes naturales y sintéticos de uso terapéutico (Maxwell)..	75
✓ Tabla I.13. Antioxidantes naturales y sintéticos (Maxwell).....	76
✓ Tabla I.14. Antioxidantes según su mecanismo de acción en el organismo.....	77
✓ Tabla II.1. Muestra detallada del estudio.....	105
✓ Tabla II.2. Contraindicaciones absolutas para la práctica de ejercicio físico...	106
✓ Tabla II.3. Circunstancias que requieren precauciones especiales para la práctica de ejercicio físico.....	107
✓ Tabla II.4. Participantes del grupo Melatonina.....	113
✓ Tabla II.5. Participantes del grupo Coenzima Q10.....	114
✓ Tabla II.6. Participantes del grupo <i>Phlebodium</i> .....	115
✓ Tabla II.7. Participantes del grupo Placebo.....	116
✓ Tabla II.8. Participantes del grupo Placebo.....	117
✓ Tabla II.9. Tiempo medio empleado en cada grupo.....	117
✓ Tabla III.1: Descriptivos. Bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ) en plasma al inicio y final del ejercicio físico.....	195
✓ Tabla III.2: Prueba T Student. Valores medios de bilirrubina ( $\mu\text{mol/l}$ ) al inicio y final del ejercicio.....	195
✓ Tabla III.3: Prueba de homogeneidad de varianzas.....	196
✓ Tabla III.4: ANOVA. Bilirrubina plasmática al inicio del ejercicio.....	196

- ✓ Tabla III.5:DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: bilirrubina plasmática al inicio del ejercicio.....196
- ✓ Tabla III.6: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: bilirrubina plasmática al inicio del ejercicio.....196
- ✓ Tabla III.7: ANOVA. Bilirrubina plasmática al final del ejercicio.....197
- ✓ Tabla III.8: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: bilirrubina plasmática al final del ejercicio.....197
- ✓ Tabla III.9: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: bilirrubina plasmática al final del ejercicio.....197
- ✓ Tabla III.10: Descriptivos. Colesterol total en plasma (mmol/l) al inicio y final del ejercicio físico.....198
- ✓ Tabla III.11: Prueba T Student. Valores medios de colesterol total en plasma.198
- ✓ Tabla III.12:Prueba de homogeneidad de varianzas.....199
- ✓ Tabla III.13: ANOVA. Colesterol total en plasma al inicio del ejercicio.....199
- ✓ Tabla III.14: ANOVA. Colesterol total en plasma al final del ejercicio.....199
- ✓ Tabla III.15: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: colesterol total plasmático al final del ejercicio.....199
- ✓ Tabla III.16: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: colesterol total plasmático al final del ejercicio.....199
- ✓ Tabla III.17: Descriptivos. Fosfolípidos en plasma (mmol/l) al inicio y final del ejercicio.....200
- ✓ Tabla III.18: Prueba T de Student. Fosfolípidos en plasma al inicio y final del ejercicio.....200
- ✓ Tabla III.19: Prueba de homogeneidad de varianzas.....201
- ✓ Tabla III.20: ANOVA. Fosfolípidos en plasma al inicio del ejercicio.....201

- ✓ Tabla III.21: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: fosfolípidos plasmáticos al inicio del ejercicio.....201
- ✓ Tabla III.22: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: fosfolípidos plasmáticos al final del ejercicio.....201
- ✓ Tabla III.23: ANOVA. Fosfolípidos en plasma al final del ejercicio.....202
- ✓ Tabla III.24: Descriptivos. Triglicéridos en plasma (mmol/l) al inicio y final del ejercicio físico.....202
- ✓ Tabla III.25: Prueba T de Student. Triglicéridos en plasma al inicio y final del ejercicio físico.....203
- ✓ Tabla III.26: Prueba de homogeneidad de varianzas.....203
- ✓ Tabla III.27: ANOVA. Triglicéridos en plasma al inicio del ejercicio.....204
- ✓ Tabla III.28: ANOVA. Triglicéridos en plasma al final del ejercicio.....204
- ✓ Tabla III.29: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: triglicéridos plasmáticos al final del ejercicio.....204
- ✓ Tabla III.30: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: triglicéridos plasmáticos al final del ejercicio.....204
- ✓ Tabla III.31: Descriptivos. Proteínas en plasma al inicio y final del ejercicio.205
- ✓ Tabla III.32: Prueba T de Student. Proteínas en plasma al inicio y final del ejercicio.....205
- ✓ Tabla III.33: Prueba de homogeneidad de varianzas.....206
- ✓ Tabla III.34: ANOVA. Proteínas en plasma al inicio del ejercicio.....206
- ✓ Tabla III.35: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: proteínas plasmáticas al inicio del ejercicio.....206
- ✓ Tabla III.36: Welch. Proteínas en plasma al final del ejercicio.....206
- ✓ Tabla III.37: Descriptivos. Interleukina 6 (pg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....207

✓ Tabla III.38: Prueba T de Student. Interleukina 6 (pg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....	207
✓ Tabla III.39: Prueba de homogeneidad de varianzas.....	208
✓ Tabla III.40: ANOVA. Interleukina 6 (pg/ml) al inicio del ejercicio físico.....	208
✓ Tabla III.41: ANOVA. Interleukina 6 (pg/ml) al final del ejercicio físico.....	208
✓ Tabla III.42: Descriptivos. TNF- $\alpha$ en plasma (pg/ml) al inicio y al final del ejercicio físico.....	208
✓ Tabla III.43: Prueba T de Student. TNF- $\alpha$ en plasma (pg/ml) al inicio y al final del ejercicio físico.....	209
✓ Tabla III.44: Prueba de homogeneidad de varianzas.....	209
✓ Tabla III.45: ANOVA. TNF- $\alpha$ en plasma (pg/ml) al inicio del ejercicio físico.....	209
✓ Tabla III.46: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: TNF- $\alpha$ en plasma (pg/ml) al inicio del ejercicio físico.....	210
✓ Tabla III.47: ANOVA. TNF- $\alpha$ en plasma (pg/ml) al final del ejercicio físico.....	210
✓ Tabla III.48: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: TNF- $\alpha$ en plasma (pg/ml) al final del ejercicio físico.....	210
✓ Tabla III.49: Descriptivos. Receptor antagonista de la interleukina 1 en plasma (pg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....	211
✓ Tabla III.50: Prueba T de Student. Receptor antagonista de la interleukina 1 en plasma (pg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....	211
✓ Tabla III.51: Prueba de homogeneidad de varianzas.....	212
✓ Tabla III.52: ANOVA. Receptor antagonista de la interleukina 1 en plasma (pg/ml) al inicio del ejercicio físico.....	212
✓ Tabla III.53: ANOVA. Receptor antagonista de la interleukina 1 en plasma (pg/ml) al final del ejercicio físico.....	212

- ✓ Tabla III.54: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: receptor antagonista de la interleukina 1 (pg/ml) en plasma al final del ejercicio físico.....213
- ✓ Tabla III.55: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: receptor antagonista de la interleukina 1 (pg/ml) en plasma al final del ejercicio físico.....213
- ✓ Tabla III.56: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al final del ejercicio físico.....213
- ✓ Tabla III.57: Descriptivos. Receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al inicio y al final del ejercicio físico.....214
- ✓ Tabla III.58: Prueba T de Student. Receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al inicio y al final del ejercicio físico.....214
- ✓ Tabla III.59: Prueba de homogeneidad de varianzas.....215
- ✓ Tabla III.60: Welch. Receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al inicio del ejercicio físico.....215
- ✓ Tabla III.61: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: Receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al inicio del ejercicio físico.....215
- ✓ Tabla III.62: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: Receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al inicio del ejercicio físico.....215
- ✓ Tabla III.63: ANOVA. Receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al final del ejercicio físico.....215
- ✓ Tabla III.64: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: Receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al final del ejercicio físico.....216

- ✓ Tabla III.65: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: Receptor soluble II del TNF- $\alpha$  en plasma (pg/ml) al final del ejercicio físico.....216
- ✓ Tabla III.66: Descriptivos. Viscosidad plasmática al inicio y final del ejercicio.....216
- ✓ Tabla III.67: Prueba T de Student. Viscosidad plasmática al inicio y final del ejercicio.....217
- ✓ Tabla III.68: Prueba de homogeneidad de varianzas.....217
- ✓ Tabla III.69: ANOVA. Viscosidad plasmática al inicio del ejercicio.....217
- ✓ Tabla III.70: Welch. Viscosidad plasmática al final del ejercicio.....218
- ✓ Tabla III.71: Descriptivos. Melatonina en plasma al inicio y final del ejercicio físico.....218
- ✓ Tabla III.72: Prueba T de Student. Melatonina en plasma al inicio y final del ejercicio físico.....219
- ✓ Tabla III.73: Prueba de homogeneidad de varianzas.....219
- ✓ Tabla III.74: Welch. Melatonina en plasma al inicio del ejercicio físico.....219
- ✓ Tabla III.75: DMS. Comparaciones múltiples.Variable dependiente: melatonina en plasma al inicio del ejercicio.....220
- ✓ Tabla III.76: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: melatonina en plasma al inicio del ejercicio físico.....220
- ✓ Tabla III.77: Welch. Melatonina en plasma al final del ejercicio físico.....220
- ✓ Tabla III.78: DMS. Comparaciones múltiples.Variable dependiente: melatonina en plasma al final del ejercicio.....221
- ✓ Tabla III.79: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: melatonina en plasma al final del ejercicio físico.....221

- ✓ Tabla III.80: Descriptivos. Capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg) al inicio y final del ejercicio físico.....221
- ✓ Tabla III.81: Prueba T de Student. Capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg) al inicio y final del ejercicio físico.....222
- ✓ Tabla III.82: Prueba de homogeneidad de varianzas.....222
- ✓ Tabla III.83: ANOVA. Capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg) al inicio del ejercicio físico.....222
- ✓ Tabla III.84: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: capacidad antioxidativa en plasma al inicio del ejercicio físico.....223
- ✓ Tabla III.85: ANOVA. Capacidad antioxidativa en plasma (nmol/mg) al final del ejercicio físico.....223
- ✓ Tabla III.86: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: capacidad antioxidativa en plasma al final del ejercicio físico.....223
- ✓ Tabla III.87: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: capacidad antioxidativa en plasma al final del ejercicio físico.....224
- ✓ Tabla III.88: Descriptivos. Proteínas de citosol de eritrocito al inicio y final del ejercicio físico.....224
- ✓ Tabla III.89: Prueba T de Student. Proteínas de citosol de eritrocito al inicio y final del ejercicio físico.....225
- ✓ Tabla III.90: Prueba de homogeneidad de varianzas.....225
- ✓ Tabla III.91: Welch. Proteínas de citosol de eritrocito al inicio del ejercicio físico.....225
- ✓ Tabla III.92: ANOVA. Proteínas de citosol de eritrocito al final del ejercicio físico.....226
- ✓ Tabla III.93: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: proteínas de citosol de eritrocito (mg/ml) al final del ejercicio físico.....226

- ✓ Tabla III.94: t de Dunnett. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: proteínas de citosol de eritrocito (mg/ml) al final del ejercicio físico.....226
- ✓ Tabla III.95: Descriptivos. Proteínas de membrana de eritrocito (mg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....227
- ✓ Tabla III.96: Prueba T de Student. Proteínas de membrana de eritrocito (mg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....227
- ✓ Tabla III.97: Prueba de homogeneidad de varianzas.....228
- ✓ Tabla III.98: ANOVA. Proteínas de membrana de eritrocito (mg/ml) al inicio del ejercicio físico.....228
- ✓ Tabla III.99: Welch. Proteínas de membrana de eritrocito (mg/ml) al final del ejercicio físico.....228
- ✓ Tabla III.100: Descriptivos. Hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....228
- ✓ Tabla III.101: Prueba T de Student. Hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....229
- ✓ Tabla III.102: Prueba de homogeneidad de varianzas.....229
- ✓ Tabla III.103: ANOVA. Hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) al inicio del ejercicio físico.....229
- ✓ Tabla III.104: ANOVA. Hemoglobina en citosol de eritrocito (mg/ml) al final del ejercicio físico.....230
- ✓ Tabla III.105: Descriptivos. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos basales (nmol/mg) al inicio y final del ejercicio físico.....230
- ✓ Tabla III.106: Prueba T de Student. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos basales (nmol/mg) al inicio y final del ejercicio físico.....231
- ✓ Tabla III.107: Prueba de homogeneidad de varianzas.....231



- ✓ Tabla III.108: ANOVA. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos basales (nmol/mg) al inicio del ejercicio físico.....231
- ✓ Tabla III.109: ANOVA. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos basales (nmol/mg) al final del ejercicio físico.....232
- ✓ Tabla III.110: Descriptivos. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg) al inicio y final del ejercicio físico.....232
- ✓ Tabla III.111: Prueba T de Student. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg) al inicio y final del ejercicio físico.....233
- ✓ Tabla III.112: Prueba de homogeneidad de varianzas.....233
- ✓ Tabla III.113: ANOVA. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg) al inicio del ejercicio físico.....233
- ✓ Tabla III.114: DMS. Comparaciones múltiples. Variable dependiente: hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg) al inicio del ejercicio físico.....234
- ✓ Tabla III.115: t de Dunnett. Variable dependiente: hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg) al inicio del ejercicio físico...234
- ✓ Tabla III.116: ANOVA. Hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg) al final del ejercicio físico.....234
- ✓ Tabla III.117: DMS. Variable dependiente: hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg) al final del ejercicio físico.....235
- ✓ Tabla III.118: t de Dunnett. Variable dependiente: hidroperóxidos en membrana de eritrocitos inducidos con AAPH (nmol/mg) al final del ejercicio físico.....235
- ✓ Tabla III.119: Descriptivos. 8-hidroxiguanosina en orina (pg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....235
- ✓ Tabla III.120: Prueba t de Student. 8-hidroxiguanosina en orina (pg/ml) al inicio y final del ejercicio físico.....236

✓ Tabla III.121: Prueba de homogeneidad de varianzas.....	236
✓ Tabla III.122: ANOVA. 8-hidroxiguanosina en orina (pg/ml) al inicio del ejercicio fisico.....	236
✓ Tabla III.123: ANOVA. 8-hidroxiguanosina en orina (pg/ml) al final del ejercicio fisico.....	237
✓ Tabla III.124: DMS. Variable dependiente: 8-hidroxiguanosina en orina (pg/ml) al final del ejercicio fisico.....	237
✓ Tabla III.125: Descriptivos. Creatinina en orina (mg/dl) al inicio y al final del ejercicio fisico.....	237
✓ Tabla III.126: Prueba T de Student. Creatinina en orina (mg/dl) al inicio y al final del ejercicio fisico.....	238
✓ Tabla III.127: Prueba de homogeneidad de varianzas.....	238
✓ Tabla III.128: ANOVA. Creatinina en orina (mg/dl) al inicio del ejercicio....	238
✓ Tabla III.129: ANOVA. Creatinina en orina (mg/dl) al final del ejercicio.....	239
✓ Tabla III.130: DMS. Variable dependiente: creatinina en orina (pg/ml) al final del ejercicio fisico.....	239
✓ Tabla III.131: t de Dunnett. Variable dependiente: creatinina en orina (pg/ml) al final del ejercicio fisico.....	239

