

**Universidad de Granada  
Instituto de Biotecnología  
Centro de Investigación Biomédica  
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud  
Grupo de Investigación CTS-01: Comunicación Intercelular**



**Evaluación del estrés oxidativo/nitrosativo y hormonal  
y su relación con la eficiencia del entrenamiento en  
deportistas**

**Melquiades Arnulfo Concepción Huertas**

**Granada, 2011**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Melquiades Arnulfo Concepción Huertas  
D.L.: GR 1555-2012  
ISBN: 978-84-9028-009-6



## ***CERTIFICACIONES***



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

CERTIFICA QUE **D. MELQUIADES ARNULFO CONCEPCIÓN HUERTAS**, Licenciado en Química por la Universidad de Panamá, República de Panamá, ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **Evaluación del estrés oxidativo/nitrosativo y hormonal y su relación con la eficiencia del entrenamiento en deportistas**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 19 de Diciembre de 2011

Vº Bº Director

El interesado

Darío Acuña-Castroviejo

Melquiades Arnulfo Concepción Huertas



Da. GERMAINE ESCAMES, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D. MELQUIADES ARNULFO CONCEPCIÓN HUERTAS**, Licenciado en Química por la Universidad de Panamá, República de Panamá, ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **Evaluación del estrés oxidativo/nitrosativo y hormonal y su relación con la eficiencia del entrenamiento en deportistas**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 19 de Diciembre de 2011

Vº Bº Director

El interesado

Germaine Escames

Melquiades Arnulfo Concepción Huertas



***FINANCIACIÓN***  
***Y***  
***PUBLICACIONES***



## **Beca y proyectos de investigación que han financiado este estudio:**

Este trabajo se ha realizado en el Laboratorio del Grupo de Investigación CTS-101: Comunicación Intercelular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, en el Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada.

### **1. Becas disfrutadas**

1. Beca SENACYT-IFARHU: Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación e Instituto para la Formación y Aprovechamiento de los Recursos Humanos de Panamá.

### **2. Proyectos de Investigación que han financiado la investigación:**

1. Financiado en parte por RD06/0013/0008 (RETICEF, ISCIII), y Grupo de Investigación CTS-101: Comunicación Intercelular (Junta de Andalucía).

2. Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) de Panamá, Programa de excelencia profesional 2006-2010.

### **3. Publicaciones científicas:**

**Autores:** Escames G, Öztürk G, Baño-Otálora B, Pozo MJ, Madrid JA, Serrano E, Concepción M, Acuña-Castroviejo D.

**Título:** Exercise and melatonin: Reciprocal benefits

**Ref. Revista:** J Pineal Res 2011; doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00924.x

**Financiación:** CTS-101; RD06/0013/0008

**Áreas: Posición/Áreas:** Physiology – 5/77

**F. Impacto:** 5.855

**PMDI:** 21848991

**Autores:** Concepción M, Chiroso-Ríos LJ, Chiroso-Ríos IJ, Romero-Prieto V, Aguilar-Martínez D, de Haro T, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

**Título:** Changes in the redox status and inflammatory response in handball players following one-year competition

**Ref. Revista:** Scand J Med Sci Sports 2011 (submitted).

**Financiación:** CTS-101; RD06/0013/0008

**Áreas: Posición/Áreas:** Sports Sciences

**F. Impacto:** 2.794



#### **4. Congresos:**

**Autores:** Concepción-Huertas MA, Chirosa Ríos LJ, de Haro, T, Chirosa Ríos JJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D

**Título:** Estrés oxidativo y estatus inflamatorio en jugadores de balonmano durante un año de competición

**Tipo de participación:** póster

**Congreso:** I Congreso Internacional en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte

**Publicación:** Actas del Congreso

**Lugar de Celebración:** Vitoria, España

**Fechas de Celebración:** 25/11/2011

**Autores:** Leonardo-Mendonça RC, Guerra-Hernández E, Zabala M, Concepción-Huertas MA, Acuña-Castroviejo D.

**Título:** Estado redox y capacidad antioxidante total en ciclistas profesionales

**Tipo de participación:** póster

**Congreso:** I Congreso Internacional en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte

**Publicación:** Actas del Congreso

**Lugar de Celebración:** Vitoria, España

**Fechas de Celebración:** 25/11/2011

**Autores:** Concepción-Huertas MA, Guerra-Hernández E, García-Villanova B, Mesías M, Molina-Romero AC

**Título:** Determinación de la capacidad antioxidante total de patatas sometidas a diferentes procesos de cocción

**Tipo de participación:** póster

**Congreso:** VII Congreso Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética

**Publicación:** Actas del Congreso y Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria 31(1) 2011

**Lugar de Celebración:** Madrid, España

**Fechas de Celebración:** 31/03/2011



## ***AGRADECIMIENTOS***



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores: el Dr Dario Acuña Castroviejo y la Dra Germaine Escames por su excelente dirección en la realización de este trabajo de investigación y por su apoyo y estímulo durante mi doctorado.

A la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) y al Instituto para la Formación y Aprovechamiento de los Recursos Humanos (IFARHU) de Panamá por el beneficio de la beca concedida para la realización de mis estudios de doctorado.

A la Universidad de Panamá, la institución donde laboro, por la concesión de la licencia por estudios que me permitió iniciar y culminar mis estudios en la Universidad de Granada. Un agradecimiento especial a mis compañeras y compañeros del Departamento de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá por hacerse cargo de mi trabajo durante mi ausencia. Muchas gracias a todos.

A los jugadores del Club de Balonmano Puente Genil, sujetos de este estudio, a su entrenador Luis Javier Chiroso, a su asistente Victor Romero y su esposa Mariangel por toda la colaboración prestada para la realización de este trabajo

Al Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada especialmente a su director el Dr Tomás de Haro y al técnico de laboratorio Sr Diego Ramos por su valiosa ayuda y colaboración en la realización de este estudio.

A mis padres y hermanos especialmente a mi madre María Cruz que todo los días, a pesar de los años, me incluye en sus cotidianas plegarias. A mi hermana Carmen Coralía por su cariño incondicional. A la memoria de mi abuela Emilia por su herencia de amor y bondad. Gracias por quererme tanto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio del grupo CTS-101: Araceli, José Antonio, Carolina, Roberto, José Carlos, Ana, Francis, Luis Carlos, Carmen, Laura, Alberto, Mariam, Huayqui, Jesús y Javier, gracias por su colaboración y por los momentos que pasamos juntos dentro y fuera del laboratorio. Agradezco a Doña Paqui por su comida casera y deliciosa. Hasta siempre amigos

A mis incondicionales amigas y amigos: Marta, Antonio, Ricardo, Gloria, Eric, Ihab e Irina por apoyarme y motivarme cada día a seguir adelante en la búsqueda de mis objetivos. Muchas gracias y ustedes saben que los quiero mucho.

Infinitas gracias a todos



“ Si empezamos con certezas, terminaremos en dudas; pero si empezamos con dudas y somos pacientes con ellas, terminaremos en certezas”.

Francis Bacon



## ***INDICE***



## **Índice general**

### **I. Introducción**

1. Resumen	3
2. El deporte de balonmano	4
2.1 Planificación del entrenamiento	4
2.1.1 Concepto de carga.	5
2.1.2 Estructuras básicas y modelos de planificación.	6
2.2 Clasificación y características de los ejercicios realizados durante las sesiones de entrenamiento.	8
3. Movilización de sustratos energéticos y perfil metabólico durante el ejercicio y el entrenamiento físico.	9
4. Respuesta adaptativa al ejercicio.	12
4.1 Daño muscular y respuesta inflamatoria inducida por la carga física.	12
4.1.1 Marcadores de daño muscular	12
4.1.2 Fatiga muscular	15
4.1.3 Procesos inflamatorios musculares	17
4.2. Estrés oxidativo y ejercicio	22
4.2.1 Radicales libres y enzimas involucrados en su producción.	22
4.2.2 Sistemas antioxidantes.	25
4.2.3 El ejercicio como fuente de estrés oxidativo	27
5. Estrés oxidativo/nitrosativo y la protección antioxidante durante el ejercicio físico.	32
6. Monitorización del entrenamiento físico deportivo	37

### **II. Hipótesis y objetivos** 39

### **III. Sujetos y métodos** 43

1. Sujetos de estudio	45
2. Diseño del entrenamiento	45
3. Evaluación de la actividad física	49
4. Toma y preparación de las muestras	50
5. Métodos	51
5.1. Técnicas y procedimientos empleados	51

5.1.1. Determinación del perfil metabólico, renal, y daño muscular de los jugadores	51
5.1.2. Determinación de marcadores de estrés oxidativo	52
5.1.3. Determinación del estado inflamatorio: NOx y citoquinas	53
6. Análisis estadístico	54
<b>IV. Resultados</b>	<b>55</b>
1.Actividad física	57
2. Metabolismo de lípidos y carbohidratos	58
3.Función renal y electrolitos.	62
4.Función hepática.	63
5.Hormonas de estrés y marcadores de daño muscular.	64
6.Estado redox	67
7.Estado inflamatorio	71
<b>V. Discusión de resultados</b>	<b>73</b>
1. Actividad física y programa de entrenamiento	75
2. Metabolismo de lípidos y carbohidratos	76
3.Función renal y electrolitos.	77
4.Función hepática, hormonas de estrés y marcadores de daño muscular.	78
5.Estado redox	78
6.Estado inflamatorio	80
<b>VI. Conclusiones</b>	<b>83</b>
<b>VII. Bibliografía</b>	<b>87</b>
<b>Anexos</b>	<b>99</b>

## Índice de figuras

Figura 1.	Factores prooxidantes y antioxidantes externos e internos.	24
Figura 2.	Producción de anión radical superóxido por la reacción de la xantina oxidasa en situación de isquemia-reperfusión.	25
Figura 3.	Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante.	27
Figura 4.	Cambios en la actividad física según la escala de Borg en los jugadores profesionales de balonmano estudiados a lo largo de un año de competición.	57
Figura 5.	Cambios en las concentraciones séricas de colesterol, y triglicéridos en los deportistas estudiados.	58
Figura 6.	Cambios en las concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y baja densidad (LDL), y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en los jugadores estudiados.	59
Figura 7.	Cambios en los índices de riesgo aterogénico (Colesterol/HDL y LDL/HDL) en los deportistas estudiados.	61
Figura 8.	Cambios en la concentración de hemoglobina y glucosa en los deportistas durante el año de competición.	61
Figura 9.	Cambios en las concentraciones séricas de ácido úrico, urea y creatinina en los deportistas durante el año de competición.	62
Figura 10.	Cambios en las concentraciones séricas de sodio, potasio y cloruro en los jugadores.	63
Figura 11	Cambios en las actividades séricas de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en los jugadores durante el año de competición.	64
Figura 12.	Cambios en las concentraciones séricas de cortisol y testosterona en los jugadores de balonmano durante la competición.	65
Figura 13.	Cambios en las actividades séricas de LDH, CK y de mioglobina en los deportistas a lo largo del año de competición.	67
Figura 14.	Cambios en los niveles plasmáticos de nitritos (NOx) y peróxidos lipídicos (LPO) en los jugadores de balonmano durante el año de competición.	68
Figura 15.	Cambios de los niveles eritrocitarios de GSH, GSSG e índice GSSG/GSH en los jugadores de balonmano.	69
Figura 16.	Cambios en las actividades eritrocitarias de GPx y GRd en los deportistas a lo largo del año de competición.	70
Figura 17.	Cambios en los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$ y TNF $\alpha$ en los jugadores profesionales de balonmano durante un año de competición.	72

## Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación de agentes antioxidantes de acuerdo al nivel de acción	23
Tabla 2.	Estructura de entrenamiento y competición de la temporada 2008-2009	47
Tabla 3.	Parámetros de Actividad Física, metabolismo de lípidos y carbohidratos, hemoglobina y función renal de los jugadores de balonmano durante el año de competición (n=16, media±Sx)	60
Tabla 4.	Actividad Física, electrolitos principales, perfil hepático, hormonas de estrés y marcadores de daño muscular de los jugadores de balonmano durante el año de competición, (n=16, media±Sx)	66
Tabla 5.	Actividad Física y parámetros oxidativos e inflamatorios de los jugadores de balonmano durante el año de competición, (n=16, media±Sx)	71

## Glosario de abreviaturas

<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>
ADH	Hormona antidiurética
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín Trifosfato
ATR	Acumulación, transformación, realización
CK	Creatina quinasa
CoA	Coenzima A
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
G-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos
GPx	Glutation peroxidasa
GRd	Glutation reductasa
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
4-HDA	4-Hidroxialquenal
HDL	High Density Lipoprotein
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IL-1 $\beta$	Interleuquina-1beta
IL-1ra	Interleuquina-1 receptor antagonista
IL-4	Interleuquina-4
IL-6	Interleuquina-6
IL-8	Interleuquina-8
I IL-10	Interleuquina-10
INF $\gamma$	Interferón gama
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Low density lipoprotein
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica de monocito
M-CSF	Factor estimulante de colonia de macrófagos
MDA	Malondialdehído
MCV	Máxima contracción voluntaria
MIP-1 $\alpha$ y $\beta$	Proteína inflamatoria de macrófago alfa y beta
mRNA	RNA mensajero
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF $\kappa\beta$	Nuclear factor kappa beta
NK	Natural killer
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RNS	Reactive nitrogen species
RONS	Reactive oxygen and nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RPE	Rating of perceived exertion
SOD	Subperóxido dismutasa
sTNF-R	Soluble Tumour Necrosis Factor Alpha Receptor
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
VLDL	Very low density lipoprotein



## ***I. INTRODUCCIÓN***

## *Introducción*

## **1. Resumen.**

Este trabajo de investigación se enmarca dentro del área de la Fisiología del Ejercicio y se fundamenta en los conocimientos recientes sobre estrés metabólico y oxidativo como resultado de la realización de cargas variables de ejercicio en deportistas con una condición física previa y bajo un programa de entrenamiento específico. Podemos decir que este trabajo es pionero en el estudio del balonmano porque considera aspectos que no habían sido abordados con anterioridad en los pocos estudios que se han hecho de este deporte. Esta investigación acumula evidencias del perfil metabólico, el daño muscular, el estrés oxidativo, la eficiencia del sistema de defensa primaria antioxidante y la respuesta inflamatoria en jugadores del deporte de balonmano. Los sujetos estudiados son jugadores profesionales de un equipo de balonmano de primera división nacional masculina de España durante la temporada 2008-2009, que fueron sometidos a un programa de entrenamiento con la finalidad de competir en la liga nacional. Se midieron parámetros metabólicos y oxidativos durante todo el proceso de entrenamiento y competición que incluía dos macrociclos de preparación física divididos en mesociclos y estos a su vez en microciclos. La toma de muestras se hizo dentro de los períodos de descanso conocidos en el lenguaje deportivo como microciclos de descanso o recuperación. Esta investigación relacionó el estrés metabólico y oxidativo con la medición de diferentes parámetros metabólicos, hormonas de estrés, daño oxidativo, defensa antioxidante y respuesta inflamatoria, a través de la asociación de variables cuantitativas que fueron medidas mediante protocolos estandarizados y técnicas bioquímicas como espectrofotometría; espectrofluorimetría y citometría de flujo, entre otras. Es indudable que el entrenamiento físico juega un papel importante dentro del desempeño de un deportista pero muchas veces se dejan de lado las consecuencias a la salud que puede acarrear un entrenamiento mal llevado. Es por esta razón que nuestro trabajo aporta información valiosa sobre los efectos fisiológicos de un programa de entrenamiento sistematizado en los jugadores de un deporte colectivo como el balonmano. Cabe destacar que España tiene un historial de éxito dentro del deporte de balonmano y esperamos que lo siga teniendo, más aún si se pueden utilizar los resultados de nuestro trabajo para mejorar en alguna forma la preparación de los jugadores sin sacrificar su salud física.

## **2. El deporte de balonmano.**

El balonmano es un deporte de cooperación/oposición, donde los jugadores interaccionan en el mismo espacio de juego y cuyo objetivo es marcar gol en la portería del equipo contrario. Una característica de este tipo de deporte es la intermitencia en los esfuerzos, ya que el jugador no participa de una forma continua en el juego. El deportista corre, anda, salta, esquivo, golpea, etc. (Hernández, 1998), por lo que se produce una discontinuidad en los esfuerzos realizados. Se puede decir, que las demandas metabólicas engloban tanto la vía energética aeróbica como anaeróbica, utilizando la energía proveniente del ATP-fosfocreatina y de la vía anaeróbica para las actividades de alta intensidad; y la vía aeróbica para las de baja intensidad, a modo de recuperación (Wallace y Cardinale, 1997).

### **2.1. Planificación del entrenamiento.**

Diversos autores han definido el proceso de planificación de diferentes formas: Seirul-lo, (Seirul-lo Vargas, 1998) define el concepto de planificación en deportes de equipo como “la propuesta teórica constituida por la descripción, organización y diseño, de todos y cada uno de los acontecimientos del entrenamiento, en una determinada fase de la vida deportiva de un deportista, así como de los mecanismos de control que permitan modificar esos acontecimientos a fin de obtener un, cada vez más ajustado, proceso de entrenamiento, para que su destinatario pueda lograr los resultados deseados en la competición deportiva” (Cuadrado Reyes, 2010). Sánchez Bañuelos define planificación como “el proceso mediante el cual el entrenador busca y determina alternativas y vías de acción que con mayor probabilidad puedan conducir al éxito” (Sanchez-Bañuelos, 1994). Mestre define el proceso de planificación como “prever con suficiente anticipación los hechos, las acciones, de forma que su acometida se efectúe de forma sistemática y racional, acorde con las necesidades y posibilidades reales, con aprovechamiento pleno de los recursos disponibles en el momento y previsibles en el futuro” (Mestre, 1995). García-Verdugo habla de la planificación deportiva asemejándola a un viaje, donde tenemos un punto de inicio y un punto de llegada. En ese viaje tenemos que realizar una serie de previsiones para que la llegada al punto de destino se realice sin contratiempos y en el tiempo previsto (García-Verdugo, 2008). Al fin y al cabo la planificación es adelantarnos a todo lo que creemos “predecible” que

puede ocurrir en un proceso de entrenamiento. Ya que especialmente en un ámbito como es el deporte colectivo donde se suele competir cada semana, la planificación en ocasiones irá en relación a los éxitos o fracasos que el equipo contraiga en los diferentes encuentros. Una correcta estructuración de la carga de entrenamiento será fundamental para la preparación del deportista. Matveiev define la preparación del deportista como “un proceso multifacético de utilización racional del total de factores (medios, métodos y condiciones) que permiten influir de manera dirigida sobre el crecimiento del deportista y asegurar el grado necesario de su disposición a alcanzar elevadas marcas deportivas” (Matveiev, 1985). Para conseguirlo será importante dirigir correctamente la carga de entrenamiento para llegar al objetivo propuesto.

### **2.1.1. Concepto de carga.**

Zintl define la carga como “La totalidad de estímulos de entrenamiento efectuados sobre el organismo” (Zintl, 1991). La carga de entrenamiento tiene su efecto óptimo, ya que no por aplicar más carga será mejor, sino que cada momento y deportista deberá aplicársele un estímulo determinado. Por encima del umbral se provocaría un efecto de sobre-entrenamiento mientras que si el estímulo es por debajo del umbral mínimo, no tendría efecto alguno sobre el rendimiento. Autores como Zintl (Zintl, 1991), Platonov (Platonov, 2001) o Vasconcelos (Vasconcelos, 2000), distinguen dos aspectos de la carga de entrenamiento:

**Carga externa:** Es el conjunto de actividades que proponemos a los deportistas para provocar adaptaciones en el organismo. En definitiva, el número de repeticiones, series, metros, etc., que deben realizar los deportistas dentro de un programa de entrenamiento.

**Carga interna:** Es la respuesta individual del organismo frente a las exigencias propuestas por la carga externa. Se pueden cuantificar en relación a la exactitud de diferentes parámetros fisiológicos (frecuencia cardíaca, consumo de oxígeno, percepción subjetiva del esfuerzo, concentración de lactato en sangre, etc.). En relación a la carga de entrenamiento, Verjoshanski determina los siguientes aspectos a tener en cuenta (Verjoshanski, 1990):

- Contenido:** carácter específico y potencial de entrenamiento
- Volumen:** magnitud, duración e intensidad
- Organización:** distribución e interconexión

El método más utilizado para estimar la carga interna desarrollada por el deportista de una forma subjetiva es la escala de la percepción subjetiva del esfuerzo con sus diferentes variantes que se representa con las siglas en inglés “RPE” que significan “Rating of perceived exertion”. La escala de la RPE es una forma de estimar la carga, que ha sido muy utilizada por múltiples autores tanto en deportes colectivos como en deportes individuales. Existen dos tipos de escalas creadas por Borg, en algunos estudios usan la escala que oscila de 0 a 10 puntos (Borg, 1962), mientras que en otros muchos estudios la escala utilizada está compuesta por 15 puntos los cuales oscilan del 6 al 20. La escala de 15 puntos, creada por Borg, parte de 6 hasta 20, y si multiplicamos el número resultante por diez, tendremos un valor aproximado a la frecuencia cardiaca del sujeto durante el ejercicio concreto. Existen relaciones entre ambas escalas, aunque no contrastadas. Ambas escalas se usan indistintamente y son igualmente válidas para las tomas de la percepción subjetiva del esfuerzo (Borg, 1990). La RPE es una forma subjetiva pero válida para estimar la carga de entrenamiento. Según muchos autores, su asociación con la frecuencia cardiaca será una forma adecuada para el control del entrenamiento.

### **2.1.2. Estructuras básicas y modelos de planificación.**

En entrenamiento moderno la tendencia es adecuar la planificación a las necesidades del equipo, no siguiendo un modelo “cerrado” a la hora de planificar (Gamble, 2006). Siguiendo a Tous (Tous, 1999), podríamos resaltar dos modelos de planificación del entrenamiento en deportes de equipo:

**Bloques concentrados de Verjoshansky:** donde distribuye la carga de la siguiente forma: un mesociclo de carga: 3-4 microciclos; un mesociclo de transformación: 3 microciclos; un mesociclo de competición: 2-3 microciclos. Al final de la temporada, se la carga se distribuiría en 1 mesociclo de carga, 2 mesociclos de transformación, y 2 mesociclos de competición. Al fin y al cabo es muy similar al concepto actual de ATR (acumulación, transformación, realización). En este sentido, autores como Herrero y Cuadrado (Herrero and Cuadrado, 2004) proponen un modelo de planificación mediante el ATR en baloncesto y señalan que la planificación no es un proceso cerrado, sino que hay que ajustarla a la realidad del equipo.

**Microestructura de Seirulo:** Seirulo distribuye las cargas en microciclos. Con la disposición de los microciclos según el momento de la temporada, se conseguirán entre 50 - 60 momentos óptimos de forma. Propone 3 tipos de microciclos:

- Microciclos de pretemporada
- Microciclos de competición
- Microciclos de descanso

La estructura del microciclo será muy parecida a la estructura de la pretemporada, pero cambiado según los días de la semana. La estructura básica utilizada en la planificación es el microciclo en sus diferentes formas. Con esos datos, se plantean diferentes modelos de microciclos como unidad básica del entrenamiento:

**-Descarga:** estos microciclos tienen como objetivo recuperar a nivel psico-físico al deportista. Los volúmenes de carga se reducen drásticamente y aparecen dentro del microciclo de forma específica medios activos de recuperación (sesiones de masaje, estiramientos, relajación). Se aumentan las actividades lúdicas para descongestionar psicológicamente a los jugadores (se usan medios como partidos de fútbol sala, voleibol, etc.) Este tipo de microciclos vienen precedidos de 3 o 4 microciclos de competición aprovechando los momentos en que la competición o el calendario permiten incluirlo. Estos momentos son principalmente cuando el rival es muy fuerte o el rival es muy débil. Casi siempre, por la "imagen se aprovecha que sean los partidos fuera de casa".

**-Aprendizaje:** son microciclos utilizados en el inicio de la pretemporada y en momentos puntuales de la misma para asentar los conocimientos. El volumen de trabajo "nuevo" es mayor.

**-Competición 1:** en los microciclos de competición lo principal es adaptarse al rival. La intensidad es muy alta, la especificidad es también muy alta y el volumen es relativamente bajo. No se incluye ningún contenido nuevo. Suelen ir en ciclos de tres (3 microciclo juntos máximos). Se usa contra rivales que son del mismo nivel o algo superior. (no aprendizaje, afianzar conceptos, ajustándose al rival, intensidades altas para afinar) no más de 3 seguidos.

**-Competición 2:** se aumenta la carga, aparecen conceptos de aprendizaje y existe menos preocupación por el rival, pero se sigue con una dinámica específica. Se suele utilizar de nuevo cuando el rival es débil o bastante más superior que nosotros (más carga, más aprendizaje, menos preocupación).

**-Control:** este microciclo es utilizado para la evaluación de las diferentes cualidades físicas que se están trabajando. Podremos controlar de forma objetiva la evolución de los jugadores a lo largo de la temporada aplicando este tipo de microciclos.

**-Carga:** son microciclos utilizados principalmente en momentos de pretemporada en los que todos los factores que influyen en el rendimiento se tienen que trabajar a un nivel más general. (Cuadrado Reyes, 2010).

## **2.2. Clasificación y características de los ejercicios realizados durante las sesiones de entrenamiento.**

**Ejercicios A (ataque):** en estos ejercicios se focalizaba en las acciones de ataque. Cada ejercicio tenía sus características determinadas. Dentro de estos ejercicios tenemos: A1, A3, A4 y A5. La denominación de 1 a 5 va en relación con el aumento de la dificultad, basándose exclusivamente en el número de jugadores y el acercamiento a la realidad específica del juego, de tal forma que el A1 serían ejercicios individuales, principalmente centrados en la técnica con mayor o menos grado de dificultad en el ámbito de la toma de decisión y las dificultades perceptivas pero siempre centrados en mejoras de la capacidad ejecutiva. En el polo opuesto, el A5, son situaciones reales de juego más o menos adaptadas a la dificultad del rival y a las posibilidades de mejora en el aprendizaje.

**Ejercicios C (contraataque):** estos ejercicios se utilizan para focalizar en acciones de transición de defensa – ataque y viceversa.

**Ejercicios D (defensa):** se focaliza especialmente en conceptos defensivos.

**Situaciones especiales:** denominado como “situaciones especiales” aquí englobamos a los partidos disputados en los entrenamientos y son de 5 minutos de duración (Cuadrado Reyes, 2010).

### **3. Movilización de sustratos energéticos y perfil metabólico durante el ejercicio y el entrenamiento físico.**

El cuerpo tiene varios mecanismos de producción de energía, de síntesis, de degradación y eliminación de los compuestos que conforman el metabolismo basal de un individuo. El deporte requiere una adaptación metabólica para satisfacer la acelerada demanda energética, así como la eliminación de los metabolitos innecesarios para el organismo. La adaptación orgánica dependen del tipo, intensidad y duración del ejercicio (Egermann y cols., 2003). Para un buen acondicionamiento físico, es necesario que las funciones orgánicas del individuo estén completamente ajustadas debido a que una actividad motora implica grados de sobrecargas diferenciadas sobre los sistemas que componen el cuerpo humano principalmente el sistema muscular y el cardiorrespiratorio (Clarkson y Hubal, 2002).

La identificación de las fuentes predominantes de energía de acuerdo a la carga física es fundamental para la planificación del ejercicio y el entrenamiento. Así, disponemos de los enlaces fosfatos de alta energía (ATP y fosfocreatina) en el sistema inmediato de transferencia energética, el sistema a corto plazo del ácido láctico y el sistema aeróbico de largo plazo de la oxidación de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los enlaces fosfato de alta energía almacenados dentro de los músculos proporcionan la energía para cargas de corta duración e intensidad elevada, como el levantamiento de un peso pesado y el sprint de la prueba wingate. Los sistemas ATP-fosfocreatina y ácido láctico proporcionan alrededor de la mitad de la energía que se necesita para un ejercicio que dure 2 minutos y que pretenda alcanzar un buen rendimiento, mientras que el resto lo proporcionan las reacciones aeróbicas. Para un rendimiento más alto en un ejercicio intenso de 2 minutos, una persona debe poseer una capacidad bien desarrollada de metabolismo aeróbico y anaeróbico. El ejercicio intenso de duración intermedia realizado durante 5 a 10 minutos, como la lucha y el juego de balonmano, exige una mayor transferencia de energía aeróbica. El ciclismo necesita un suministro constante de energía de procedencia aeróbica sin depender de la formación de lactato. La intensidad y duración de la carga física determinan el patrón de participación de los sistemas de transferencia energética (Serrano Corro, 2009). El sistema aeróbico predomina en el ejercicio dinámico. A elevada intensidad participa dos veces más el metabolismo de los carbohidratos que el de las grasas y proteínas y a baja intensidad, las grasas son el principal combustible. La oxidación de carbohidratos y lípidos está

cuidadosamente regulada durante el ejercicio dinámico. La degradación de unidades glucosilo derivadas del glucógeno muscular y la glucosa en sangre generan piruvato mediante la glucólisis, el cual puede ser oxidado o convertido a lactato y alanina. La piruvato deshidrogenasa (PDH) es un complejo multienzimático de la matriz mitocondrial que convierte el piruvato en acetil coenzima A (CoA). Esta enzima regula la entrada de carbohidratos en el ciclo del ácido tricarboxílico y su subsecuente oxidación. Los mayores activadores de PDH durante el ejercicio son el influjo de calcio en el músculo y el ADP, ya que ambos estimulan la glucólisis y la producción de piruvato, el cual es otro activador de PDH. Quizás una de las respuestas más estudiadas al ejercicio es el lactato sanguíneo durante el ejercicio incremental. El incremento exponencial de lactato sanguíneo sigue al incremento de la tasa glucolítica y la glucogenólisis muscular durante el ejercicio incremental. En esencia, existe una relación íntima entre el umbral láctico, la capacidad de oxidación muscular y la tasa de utilización de carbohidratos durante el ejercicio dinámico (Coyle y cols., 1988).

El lactato es un metabolito intermediario importante durante y después del ejercicio, ya que es un sustrato para el metabolismo oxidativo y precursor gluconeogénico. El músculo activo es el principal sitio de oxidación de lactato durante ejercicio, el cual contribuye con el 30% de la oxidación total de carbohidratos (Van Hall y cols., 2003). En el período post ejercicio se requiere el reabastecimiento de los depósitos de glucógeno muscular. La depleción de glucógeno inducida por ejercicio activa la glucógeno sintasa. Además, la síntesis de glucógeno muscular depende de la ingestión de carbohidratos, que elevan la glucosa y la insulina en sangre. Particularmente, la insulina estimula la translocación del transportador GLUT4 al sarcolema y activa la glucógeno sintasa. En el metabolismo de lípidos, la habilidad del tejido adiposo para responder al ejercicio dinámico mediante la activación de la hidrólisis de triglicéridos y la liberación de ácidos grasos libres a la sangre es importante para aumentar y sostener la disponibilidad de ácidos grasos libres en el músculo activo. La regulación de la lipólisis del tejido adiposo está enfocada al control de la actividad de la lipasa sensible a hormona. Esta enzima es limitante en la degradación de triglicéridos a diacilglicerol y ácido graso libre y de diacilglicerol en monoacilglicerol y ácido graso libre. El aumento plasmático de catecolaminas durante el ejercicio eleva la actividad de la lipasa sensible a hormona.

El entrenamiento físico genera adaptaciones metabólicas. Las principales adaptaciones metabólicas al entrenamiento aeróbico se ven reflejadas en cambios de la

potencia aeróbica, en las adaptaciones musculares tales como hipertrofia, angiogénesis, inducciones enzimáticas y en los suministros energéticos. Hay mayores depósitos de glucógeno y triglicérido muscular, disminuye la actividad simpática en el ejercicio agudo y se reduce la utilización de carbohidratos durante el ejercicio submáximo. El entrenamiento anaeróbico refuerza la potencia y la capacidad anaeróbica, favorece el reclutamiento de fibras rápidas y los sistemas energéticos ATP-fosfocreatina y glucólisis anaeróbica. Ocurre inducción de lactato deshidrogenasa y fosfofructoquinasa y elevación del umbral láctico. La capacidad de amortiguación muscular también mejora en el entrenamiento anaeróbico. Los entrenamientos aeróbicos combinados de fuerza y resistencia también inducen cambios adaptativos en la respuesta endocrina y el perfil metabólico sanguíneo. El entrenamiento aumenta la sensibilidad a la insulina; el descenso normal de la insulina durante el ejercicio está muy reducido en respuesta al entrenamiento. Con el entrenamiento hay un menor aumento de la concentración de glucosa durante el ejercicio con cargas semejantes de trabajo tanto absolutas como relativas (Serrano Corro, 2009).

Se han llevado a cabo numerosos estudios relacionados con los niveles plasmáticos de lipoproteínas y el ejercicio físico en la prevención de enfermedades cardiovasculares (DE Matos y colbs., 2011). Aunque se conoce que el ejercicio regular disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular, los estudios sugieren que el ejercicio tiene poco efecto sobre el colesterol total y la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y sólo un mínimo efecto beneficioso sobre la fracción de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Leon y Sanchez, 2001), existiendo controversias acerca de la forma más efectiva y la intensidad de los ejercicios (Kraus y colbs., 2002), por lo que es necesario conocer mejor los mecanismos de acción del ejercicio físico sobre el perfil lipídico (Katzmarzyk y colbs., 2001).

El ejercicio es conocido por ser un poderoso estímulo del sistema endocrino. El ejercicio induce alteraciones en las concentraciones y proporciones hormonales que pueden tener una influencia positiva sobre los músculos (Tarpinning KM y colbs., 2001), lo cual tendría un efecto deseable en los atletas. La respuesta hormonal al ejercicio depende de varios factores, como la intensidad, duración, tipo de ejercicio, y el nivel de entrenamiento del sujeto. Los entrenados tienen ligeras elevaciones de cortisolemia durante el ejercicio.(Tremblay MS y colbs., 2004).

#### **4. Respuesta adaptativa al ejercicio.**

Un episodio de actividad física genera un conjunto de respuestas fisiológicas inmediatas conocidas como respuestas adaptativas al ejercicio agudo. Estas respuestas involucran a todos los sistemas corporales. La práctica habitual de ejercicio o el entrenamiento físico genera modificaciones en estas respuestas al episodio agudo y también en estado de reposo. Este conjunto de modificaciones fisiológicas se denominan respuestas adaptativas al ejercicio crónico. La realización de ejercicio físico tiene por objeto estimular la adaptación morfológica, estructural y funcional de los órganos implicados, directa o indirectamente y mejorar la capacidad de rendimiento físico. La realización de ejercicio y entrenamiento físico conllevan una serie de beneficios y demandas sobre el organismo que son dependientes de la carga, forma, intensidad, volumen y duración. Los beneficios pueden tener alcances en el rendimiento físico y mental, en los sistemas de transferencia energética y en la salud cardiovascular. Las mayores demandas metabólicas tienen implicaciones en el estrés oxidativo, el daño muscular, en los procesos de inflamación, reparación y en el estado inmunológico. El ejercicio intenso induce especialmente respuestas inflamatorias en los músculos activos, sobreproducción de radicales libres y cuantiosas movilizaciones de los sustratos energéticos. Por lo tanto, la previsión de la magnitud de daño muscular, de los patrones de respuesta antioxidante y de citoquinas en relación con las cargas de trabajo físico ayuda a intervenir oportunamente en los entrenamientos y a proponer guías metabólicas para la monitorización de la evolución del rendimiento y la condición física.

#### **4.1. Daño muscular y respuesta inflamatoria inducida por la carga física**

##### **4.1.1. Marcadores de daño muscular**

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

inflamación incluyen edema, eritema, calor, dolor e impotencia funcional. Los marcadores de daño muscular incluyen una serie de enzimas, proteínas contráctiles y reguladoras contenidas en las fibras musculares esqueléticas. La enzima aspartato aminotransferasa (AST), también conocida como transaminasa glutámico oxaloacética (GOT), fue el primer marcador empleado para el diagnóstico de laboratorio de daño muscular, sobre todo de infarto agudo de miocardio; pero carece de especificidad de tipo de fibra muscular esquelética. La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentra en casi cualquier tejido, especialmente en músculo esquelético, hígado, corazón, riñón, cerebro, pulmón y eritrocitos. La LDH consiste en un tetrámero compuesto por dos subunidades, M (músculo) y H (corazón). La expresión de la subunidad M es una adaptación en respuesta a un aumento de la glucogenólisis anaerobia para el aporte de energía, dado que alcanza su máxima actividad ante altas concentraciones de piruvato. Esto explica por qué el músculo esquelético sometido a estrés crónico sobre-expresa las isoenzimas LDH-1 y LDH-2 con predominio de subunidades M. La enzima creatina quinasa (CK) es clave en la producción de energía celular y en el metabolismo muscular. Existen dos formas de CK, una mitocondrial y otra citosólica. La CK citosólica presenta una unión significativa a las miofibrillas en el músculo esquelético y cardíaco. Es una molécula dimerica compuesta de subunidades B (forma cerebral) o bien M (forma muscular) y existen tres isoenzimas: CKBB (CK-1), CKMB (CK-2) y CK MM (CK-3). La forma mitocondrial de la enzima es también un dímero y probablemente está compuesta de dos subunidades idénticas (CK-Mi). Clínicamente sólo se observa actividad significativa de CK en músculo esquelético, corazón, cerebro, intestino y el útero durante la gestación, encontrándose la máxima concentración en el músculo esquelético. En todos los demás órganos existe una baja concentración o bien una masa insuficiente como para contribuir significativamente a los niveles plasmáticos. La CK-MM supone la mayor parte de la actividad de la CK del músculo esquelético. El contenido de CK-MB en el músculo esquelético varía dependiendo de la proporción de fibras de contracción lenta, que pueden contener hasta un 5-10% de CK-MB, mientras que las fibras de contracción rápida contienen menos de un 3%. Con el entrenamiento de resistencia, la CK-MB se acumula en el músculo esquelético y puede alcanzar los niveles miocárdicos, motivo por el cual, un nivel elevado de CK-MB, tras ejercicio muscular en atletas debería interpretarse como un indicador de daño muscular esquelético. La degeneración y regeneración crónica muscular conducen a un marcado aumento del contenido de CK-MB. Puede suceder una

disminución de la CK sérica tras estímulos de ejercicio continuados; lo cual sugiere que se produciría un menor daño muscular tras el entrenamiento. Este hecho implica el efecto protector muscular del esfuerzo físico regular. A pesar de su asociación con el daño muscular, no se ha encontrado una correlación entre los niveles de CK séricos y el dolor muscular de inicio tardío. Estudios con atletas de resistencia muestran modificaciones bioquímicas típicas, en 12 a 24 horas después de la práctica deportiva, caracterizadas por un aumento en la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH), CK total y sus fracciones (CK-MM y MB, respectivamente). A menudo, el aumento de la actividad y/o la concentración de algunos marcadores bioquímicos de lesión no acompañan a los cambios significativos en el electrocardiograma, examen clínico o en el desempeño atlético. Esta condición puede ser ejemplificada por el hecho de que algunos atletas pueden mostrar un aumento de alrededor de 30 veces en la actividad de CK después de 24 horas de esfuerzo, sin comprometer el rendimiento o la salud. Por otro lado, un cuadro de rhabdomiolisis puede ser detectado en atletas cuya CK está aumentada en 15 veces o aún menos (Siegel y cols., 1997).

Por su parte, la mioglobina es una proteína fijadora de oxígeno presente en el músculo estriado que se libera rápidamente tras el daño muscular. La mioglobina facilita la difusión de oxígeno en las fibras musculares estriadas y también sirve como depósito de oxígeno en la propia fibra muscular. La mioglobina sólo se encuentra en músculos estriados (esquelético y cardíaco), donde llega a representar un 5-10% de todas las proteínas citoplasmáticas. Su concentración en sangre aumenta rápidamente tras el daño muscular, normalmente entre 2 y 4 horas, y llega al máximo en 5-10 horas siendo su valoración una ayuda interesante a la hora de conocer el estado y la evolución del músculo. Los estudios que implican valores de referencia para los parámetros bioquímicos y hematológicos de deportistas profesionales durante una sesión de entrenamiento no han sido concluyentes (Febbraio y Dancy, 1999) Esto se debe al hecho de que en algunos cambios bioquímicos puede influir el género, la variación cronobiológica, ciclo circadiano, el descanso previo, la intensidad del entrenamiento, la estacionalidad, condiciones climáticas, la hidratación, entre otros. Además de esto, varios estudios muestran cambios bioquímicos normales que no representan alteraciones patológicas dificultando el diagnóstico de lesiones silenciosas (Apple y cols., 1986) Por lo tanto, el diagnóstico clínico de microlesiones y sobreentrenamiento siempre se debe realizar teniendo en cuenta los aspectos bioquímicos, clínicos y de rendimiento deportivo (Echegaray y Rivera, 2001).

#### **4.1.2. Fatiga muscular.**

Durante el periodo de entrenamiento y competición, los requerimientos del organismo son intensos y mantenidos a lo largo del tiempo, obligando a establecer unos periodos de recuperación y regeneración tisular, que si no son respetados conducen a la fatiga. La fatiga se define como la disminución de la capacidad de producción de fuerza, medida preferiblemente en una máxima contracción voluntaria (MCV) o en un tétanos provocado eléctricamente. La fatiga aguda ocurre durante una sesión de ejercicio sea por entrenamiento o competición, produciendo una disminución del rendimiento o una parada del ejercicio. La fatiga aguda muscular o de sobre-esfuerzo generalmente ocurre después de una sesión de entrenamiento que excede el nivel de tolerancia al esfuerzo en el músculo. Está acompañada de lesión del tejido muscular, afectando solamente a los músculos involucrados en el ejercicio. La fatiga subaguda, también llamada sobrecarga, ocurre después de uno o varios microciclos relativamente intensos. La fatiga crónica aparece después de varios microciclos en los que la relación entrenamiento o competición y recuperación se desequilibran, lo cual ocasiona un cuadro sistémico de descenso de rendimiento y fatiga.

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

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

Cuando los atletas entrenados en resistencia desarrollan fatiga en situaciones de actividades de muy larga duración, generalmente está implicada la falta adaptativa de la beta oxidación de las grasas. Por otro lado, los altos niveles de  $NH_4^+$  (catión amonio) en sangre están asociados con el inicio de la fatiga muscular local que sigue a un ejercicio de entrenamiento de alta intensidad. Cuando la concentración de amonio aumenta dentro del músculo, suprime el metabolismo oxidativo por inhibición de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa. Sin embargo, el entrenamiento puede disminuir el nivel de  $NH_4^+$  en sangre y retrasar el inicio de la fatiga en ejercicios de duración más prolongada. El aumento de la concentración de ácido láctico tiene también un efecto directo sobre la osmolaridad celular, causando un cambio en el volumen de agua en el interior del músculo. El incremento subsiguiente de la presión intracelular conduce a una restricción de la circulación local (isquemia) y a la dilución de los iones acumulados, fenómenos que también están relacionados con el desarrollo de fatiga.

Cuando el trabajo es excéntrico, la fatiga muscular local proviene del daño mecánico, más que de los procesos químicos de la contracción muscular. Las contracciones excéntricas tienen un coste metabólico más bajo que las concéntricas, aunque, la tensión generada a través del número reducido de fibras implicadas es mayor que para las contracciones concéntricas y suficientemente grande como para producir el daño mecánico en las líneas Z, en el retículo sarcoplásmico y en el mecanismo contráctil.

#### **4.1.3. Procesos inflamatorios musculares.**

Los cambios de la ultraestructura muscular ocurren después de una respuesta inflamatoria. Habitualmente la respuesta inflamatoria es limitada; pero si el ejercicio se prolonga o si no se instauran las terapias reparadoras pertinentes, ocurre rhabdomiolisis. Inicialmente los focos de daño estructural se localizan en las miofibrillas y en el citoesqueleto. La rhabdomiolisis ocasiona liberación de enzimas musculares, aumento de mioglobina en sangre y mioglobinuria. Si a este estado se añade cierto grado de deshidratación, aumenta el riesgo y las consecuencias de la rhabdomiolisis. Además, se puede observar desestructuración en las células dañadas con una degradación de los lípidos y proteínas estructurales. Como ya hemos mencionado, entre los mecanismos de producción de fatiga tiene una relevancia especial la depleción de sustratos, la acumulación de metabolitos, las alteraciones hidroelectrolíticas y minerales, la alteración de los sistemas reguladores, la disfunción del sistema enzimático muscular, la disminución de los depósitos de proteínas musculares, las alteraciones de los sistemas de control y sus relaciones neuroendocrinas e inmunológicas.

Los procesos inflamatorios en el músculo activo son desencadenados por la liberación de moléculas mediadoras en el foco de insulto. Estas moléculas tienen distintas actividades: anafiláctica, opsonizadora, quimioatrayente, de adhesión a células endoteliales y vasodilatadora. Las moléculas responsables de la lesión tisular incluyen radicales libres, metaloproteasas, proteasas plasmáticas, mediadores lipídicos, péptidos, aminas, mioquinas, citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas. Las citoquinas son polipéptidos originalmente descubiertos en el sistema inmunológico. Sin embargo, muchos tipos celulares producen citoquinas y las funciones biológicas de las mismas van más allá de la regulación inmune. Algunas citoquinas tienen importantes funciones metabólicas y ejercen efectos locales o acciones de tipo hormonal.  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  son citoquinas pro-inflamatorias, mientras que  $\text{sTNF-R}$ ,  $\text{IL-1ra}$  e  $\text{IL-10}$  tienen funciones anti-inflamatorias.  $\text{IL-6}$  ha sido clasificada como citoquina pro y anti-inflamatoria, siendo la  $\text{IL-6}$  circulante principalmente antiinflamatoria (Xing y cols., 1998). La infusión de  $\text{IL-6}$  en humanos ocasiona fiebre, pero no produce choque ni síndrome de hiperpermeabilidad capilar, como se observa con las citoquinas pro-inflamatorias típicas  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{TNF}\alpha$ . y favorece la elevación de los niveles circulantes de las citoquinas anti-inflamatorias  $\text{IL-1ra}$  e  $\text{IL-10}$ . Además, a diferencia de  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{TNF}\alpha$ , la  $\text{IL-6}$  no regula al alza los principales mediadores de la inflamación, tal como el óxido nítrico (Barton,

1997; Barton, 1997). En cambio, IL-6 es el principal inductor de las proteínas de fase aguda derivadas del hepatocito, muchas de las cuales tienen propiedades antiinflamatorias.

Los episodios agudos de ejercicio estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias capaces de inhibir la hormona de crecimiento y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF). Además, TNF $\alpha$  e IL-1 activan la transducción de señal para la transcripción génica de NF-kB y AP-1, que son factores transcripcionales para la expresión de manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) en atletas bien entrenados. En adición, IL-6 favorece el recambio lipídico a través de la estimulación de la lipólisis y la oxidación de la grasa. De esta manera se ha sugerido que el ejercicio regular induce supresión de TNF $\alpha$  y ofrece protección contra la resistencia a la insulina inducida por TNF $\alpha$ . Recientemente se ha propuesto a la IL-6 como la primera mioquina producida y liberada por las fibras musculares esqueléticas, ejerciendo sus efectos en otros órganos de la economía. Es probable que las mioquinas sean mediadoras de los efectos beneficiosos para la salud del ejercicio y que éstas en particular estén involucradas en la protección contra las enfermedades crónicas asociadas con inflamación de bajo grado, como la diabetes mellitus y la enfermedad cardiovascular (Petersen y Pedersen, 2005)

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

Inicialmente se pensó que la respuesta de citoquinas al ejercicio reflejaba la respuesta clásica de fase aguda a la injuria muscular. El daño muscular ocurre cuando en el ejercicio se da mucho énfasis a las contracciones musculares excéntricas. Sin embargo, varios estudios han demostrado que esta respuesta de citoquinas ocurre cuando se ejecutan los movimientos mediante contracciones predominantemente concéntricas y de intensidad moderada (Febbraio y Pedersen, 2002). En relación con el ejercicio intenso de una hora de duración, que involucra contracciones excéntricas, la CK aumenta hasta 100 veces durante cinco días, tanto en sujetos jóvenes como ancianos. Sin embargo, los niveles plasmáticos de IL-6 aumentaron solamente pocas veces inmediatamente después del ejercicio, y posteriormente presenta un nuevo pico a

las cuatro horas de la recuperación. Los niveles de TNF $\alpha$  tampoco cambian mucho. El segundo pico de IL-6 suele estar estrechamente correlacionado con el nivel de CK.

En relación con el rol de las citoquinas en la respuesta inflamatoria al ejercicio, muchos estudios concluyen que la respuesta de IL-6 promueve la síntesis de citoquinas antiinflamatorias (antagonista del receptor IL-1 e IL-10), deprime la producción de TNF $\alpha$  y ayuda a movilizar los sustratos extracelulares y/o aumentar la entrega de sustratos durante el ejercicio, explicando al menos en parte los efectos beneficiosos del ejercicio para la salud (Petersen y Pedersen, 2005). Típicamente, IL-6 es la primera citoquina presente en la circulación durante ejercicio. Las concentraciones plasmáticas basales de IL-6 pueden aumentar hasta 100 veces después del ejercicio. El nivel máximo de la IL-6 se alcanza al final del ejercicio o poco después, seguido por una rápida disminución hacia niveles pre-ejercicio (Sacheck y cols., 2006). El aumento exponencial del nivel plasmático de IL-6 está relacionado con la intensidad del ejercicio, su duración, la masa muscular reclutada y la capacidad de rendimiento del sujeto (Febbraio y Pedersen, 2002). Como la IL-6 es una citoquina inflamatoria clásica se pensó que la respuesta de la IL-6 estaba relacionada con el daño muscular. Sin embargo, se ha hecho evidente que el daño muscular no es necesario para aumentar las concentraciones plasmáticas de IL-6 durante el ejercicio. Por el contrario, el ejercicio excéntrico puede dar lugar a un pico de retraso y una disminución más lenta de IL-6 plasmática durante la recuperación (Pedersen, 2011).

Se sabe que el ejercicio induce la transcripción de genes relacionados con el metabolismo en el músculo ejercitado (Pilegaard y cols., 2000), lo cual demuestra que las contracciones musculares directamente influyen en el metabolismo. El que la transcripción del gen de IL-6 ocurre localmente en el músculo esquelético contráctil y que IL-6 es vertida a la sangre en grandes cantidades desde el músculo en actividad (Febbraio y Pedersen, 2002), abre la posibilidad de que los cambios inmunológicos inducido por el ejercicio están directamente relacionados a las condiciones del músculo contráctil. Ullum et al. (Ullum y cols., 1994) demostraron que el mRNA de IL-6 en monocitos, que es la célula responsable del aumento de IL-6 en plasma durante la sepsis (Pedersen y Hoffman-Goetz, 2000), no aumenta como resultado del ejercicio. Mediante la determinación de la producción intracelular de citoquinas se demostró que el número, el porcentaje y la intensidad media de fluorescencia de monocitos teñidos positivos para IL-6 no cambia durante el ejercicio en bicicleta (Starkie y cols., 2000) y hasta disminuye durante una carrera prolongada (Starkie y cols., 2001). Para probar la

posibilidad de que el músculo activo produce IL-6 se realizaron biopsias musculares antes y después de ejercicio dinámico (Ostrowski y colbs., 1998). El mRNA de la IL-6 está presente en pequeñas cantidades en el músculo esquelético en reposo, pero aumenta hasta cien veces en actividad contráctil. Este hallazgo indica que el ejercicio es responsable de la inducción del gen IL-6. Éste es también el caso cuando las contracciones musculares concéntricas son responsables de los movimientos de la extremidad sin el compromiso de daño muscular. No solamente se activa el gen IL-6 en el músculo activo, sino también la proteína IL-6 se libera en gran cantidad desde la extremidad contráctil y contribuye marcadamente con el aumento en la concentración de plasma arterial inducida por el ejercicio (Steensberg y colbs., 2000). La infusión de IL-6 humana recombinante demuestra que IL-6 favorece la producción de cortisol con la misma cinética y en la misma intensidad que durante el ejercicio (Steensberg y colbs., 2003). Además, IL-6 induce neutrocitosis y linfopenia tardía en la misma magnitud y con la misma cinética que durante el ejercicio dinámico, lo cual sugiere que IL-6 derivada del músculo debe tener un rol central en la recirculación de leucocitos inducida por el ejercicio.

El mRNA de IL-6 está regulado al alza en el músculo esquelético contráctil (Jonsdottir y colbs., 2000) y la transcripción del gen de la IL-6 está aumentada con el ejercicio (Keller y colbs., 2001). Además, se ha demostrado que la proteína IL-6 se expresa en las fibras musculares contráctiles y responde al ejercicio con la liberación muscular de IL-6, lo cual no sucede con TNF $\alpha$  (Steensberg y colbs., 2002). Como señalamos con anterioridad, IL-6 ejerce efectos inhibitorios sobre la producción de TNF $\alpha$  e IL-1. IL-6 inhibe la producción de TNF $\alpha$  inducida por lipopolisacáridos (LPS) en cultivos de monocitos humanos y en la línea monocítica humana U937 (Schindler y colbs., 1990). En cambio, los niveles de TNF $\alpha$  están muy elevados en ratones tratados con anti-IL-6 y en ratones knockout para la IL-6 (Mizuhara y colbs., 1994). Todo ello indica que IL-6 circulante está involucrada en la regulación de TNF $\alpha$  (Netea y colbs., 1996). La respuesta de citoquina al ejercicio difiere de la respuesta a la sepsis (Suzuki y colbs., 2002; Febbraio y Pedersen, 2002); en este sentido, el hecho de que las clásicas citoquinas pro-inflamatorias, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en general no aumentan con el ejercicio submáximo, indica que la cascada de citoquinas inducida por el ejercicio difiere marcadamente de la cascada inducida por infecciones.

Durante el ejercicio de carrera extenuante, ocurren grandes aumentos en la expresión génica muscular de IL-1 $\beta$  e IL-8 y también pequeñas elevaciones en IL-10 y

TNF $\alpha$  (Nieman y colbs., 2003). Sin embargo, se desconoce si estas citoquinas también son liberadas a la circulación para desempeñar un rol en la inmunomodulación inducida por el ejercicio.

El ejercicio no induce aumento en los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$ , excepto durante el ejercicio intenso o máximo, tal como durante la carrera de maratón (Pedersen y colbs., 2001). Tampoco la IL-1 $\beta$  aumenta en sangre, o lo hace mínimamente. Estos resultados sugieren que la respuesta de TNF $\alpha$  al ejercicio depende de la carga de entrenamiento, la carga de ejercicio, las modalidades deportivas, los estilos de vida, el estado de salud, la edad y probablemente el género. Aunque TNF $\alpha$  regularmente no es detectado en el plasma, fácilmente puede ser detectado en orina dos horas después de ejercicio (Suzuki y colbs., 2002). La IL-6 parece depurarse por la vía hepatoesplénica (Febbraio y Pedersen, 2002) y también por el riñón, apareciendo en la orina. Además, las concentraciones plasmáticas de IL-4, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-8 y MCP-1 aumentan inmediatamente después de un ejercicio de corta duración y sus concentraciones urinarias aumentan (Suzuki y colbs., 2002).

El ejercicio tiene influencias sobre el sistema inmunológico, altera los factores circulantes, citoquinas y otros mediadores (lactato, IL-6, catecolaminas, hormona de crecimiento y acidosis) que pueden afectar a las células T (Fischer y colbs., 2007; Wong y colbs., 2006; Kin y Sanders, 2006). Además, los linfocitos pueden modificarse directamente por la neuroestimulación linfática inducida por el ejercicio (Shepherd y colbs., 2005; MacNeil y colbs., 1996). Algunos de los efectos del ejercicio en el sistema inmune son de naturaleza mecánica (Radom-Aizik y colbs., 2007). La IL-12 se ha relacionado con la inmunidad mediada por células desde su descubrimiento hace más de 15 años y claramente juega un rol esencial en el desarrollo de las células Th1. Su papel no está limitado a iniciar la respuesta inmune sino que contribuye a mantenerla. Por ello, las respuestas Th1 rápidamente desaparecen en ausencia de IL-12, ocasionando la pérdida de la inmunidad protectora contra patógenos intracelulares. En respuesta al ejercicio, los niveles circulantes de IL-12 aumentan (Suzuki y colbs., 2002). Sin embargo, aún no está esclarecido el papel de IL-12 inducido por el ejercicio físico.

## 4.2. Estrés oxidativo y ejercicio.

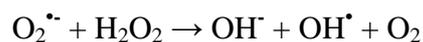
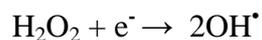
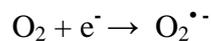
### 4.2.1. Radicales libres y enzimas involucrados en su producción.

Los radicales libres son producidos en el organismo como parte de sus funciones bioquímicas y fisiológicas. El radical libre se define como una especie química cargada con uno o más electrones desapareados en su orbital electrónico externo y que es capaz de existir independientemente (Halliwell, B. y colb., 1999). Pero el peligro de contener una gran cantidad de radicales libres consiste en que estas especies son sumamente inestables y reaccionan con otras moléculas a su alrededor, provocando paso de electrones libres y alterando el funcionamiento correcto de estas moléculas.

La formación de los radicales libres en el organismo es inevitable, pero estas especies no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está prevista de un efectivo sistema antioxidante. Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación. Este proceso consiste, básicamente, en el hecho de que un antioxidante cede un electrón al radical libre, neutralizándolo, y transformándolo en una molécula inocua.

Existen fuentes externas e internas de los radicales libres; al igual que existen dos tipos de antioxidantes: los exógenos tomados en la dieta y los endógenos, dotados por el propio sistema biológico. Otra forma de clasificar a los agentes antioxidantes es de acuerdo al nivel de su acción: primario, secundario y terciario (Tabla 1).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyen el anión superóxido  $O_2^{\bullet-}$ , peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), entre otros:



Entre las especies reactivas de nitrógeno (RNS) se incluyen el óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ ) y los peroxinitritos ( $ONOO^-$ ), estos últimos resultado de la reacción del  $NO^{\bullet}$  con el  $O_2^{\bullet-}$ .

Entre las enzimas que contribuyen a la formación de los radicales libres podemos destacar el papel de NADPH oxidasa, xantina oxidasa e iNOS. Las enzimas

intracelulares tales como, SOD y CAT, al igual que el sistema de glutatión, actúan como la primera línea de defensa frente a los radicales libres (Arrick y Nathan, 1984).

Tabla 1. Clasificación de agentes antioxidantes de acuerdo al nivel de acción

Primarios	Secundarios	Terciarios
Neutralizan los radicales libres recién formados	Capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena	Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres
Glutathion peroxidasa glutathion reductasa glutathion S- transferasa, catalasa, superóxido dismutasa	Glutathion, melatonina, vitamina E, vitamina C, $\beta$ -caroteno, ácido úrico, estrógenos	Enzimas reparadoras de ADN (endonucleasas, exonucleasas), metionina sulfóxido reductasa

(Rusanova, 2010)

Sólo cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras (Figura 1), el resultado es un daño oxidativo que puede afectar varias moléculas alterando su funcionamiento y llevando el organismo entero a un envejecimiento prematuro, enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, afecciones a nivel genético y otras patologías. Este daño oxidativo producido por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y el funcionamiento del sistema antioxidante, se denomina estrés oxidativo.

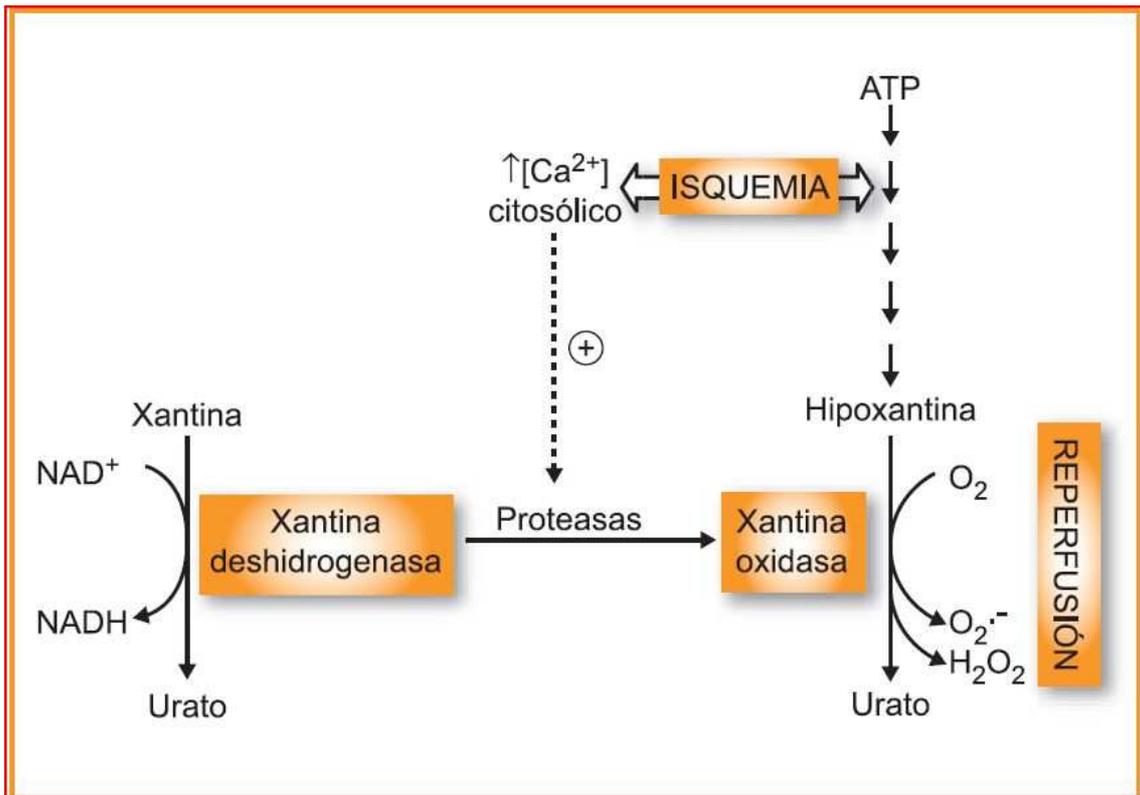
La NADPH oxidasa cataliza la reducción de oxígeno a  $O_2^{\bullet -}$ , lo que resulta en la producción de  $H_2O_2$ . Esta enzima se encuentra en la membrana de los leucocitos polimorfonucleares, es mejor caracterizada en los neutrófilos, y se activa en condiciones de inflamación, en respuesta a la presencia del organismo microbiano (Market y cols., 1984; Elsbach y Weiss, 1985).



**Figura 1.** Factores prooxidantes y antioxidantes internos.

La xantina oxidoreductasa (XOR) es un complejo molibdeno-flavoenzima, que existe en dos formas funcionalmente distintas: xantina deshidrogenasa (XDH), que produce NADH y urato; y puede ser transformada en xantina oxidasa (XO), oxígeno dependiente, que origina radical anión superóxido y/o peróxido de hidrógeno y urato. En condiciones normales la XDH representa 80% de la XOR funcional in vivo, y la XO constituye un 20% restantes. Pero en las condiciones de injuria por isquemia-reperfusión la enzima XO aumenta notablemente su actividad y contribuye a la formación de ROS (Chambers y cols., 1985; McCord, 1985). Tanto la XDH, como la XO catalizan la degradación de la hipoxantina (HX) en xantina (X), y subsecuentemente en urato. Sin embargo, sólo XO produce  $O_2^{\bullet-}$  en el último paso de esta reacción (McCord, 1985) (Figura 2).

La enzima iNOS participa en la producción de RNS en condiciones de inflamación y el estrés oxidativo (Escames y cols., 2003).



**Figura 2.** Producción de anión radical superóxido por la reacción de la xantina oxidasa en situación de isquemia-reperfusión (Gil Hernández, 2005).

#### 4.2.2. Sistemas antioxidantes.

##### Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD fue la primera enzima que se supo que actuaba sobre un radical libre y fue descubierta en 1968 (McCord y Fridovich, 1969). La familia de las superóxido dismutasas está integrada por tres tipos de metaloenzimas, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, y Fe-SOD. La Cu/Zn-SOD es la más abundante, se encuentra en la fracción soluble celular, y en los líquidos extracelulares. La SOD dependiente de  $\text{Mn}^{++}$  se encuentra en procariontas y eucariotas y se localiza en la matriz mitocondrial. En las bacterias se ha descrito una tercera forma de la SOD, dependiente de  $\text{Fe}^{++}$ .

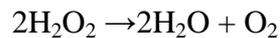
La SOD neutraliza el anión superóxido, convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno, por lo cual forma una primera línea de defensa ante la producción de ROS generados en numerosos procesos oxidativos:



La actividad de la enzima aumenta en situaciones de estrés oxidativo prolongado, normalizándose sus valores cuando la producción de ROS disminuye. No obstante, el peróxido de hidrógeno producido por la SOD es, a su vez, fuente de ROS, como el radical hidroxilo, mucho más agresivo que el radical superóxido. Por ello, es muy importante disponer de otros sistemas de defensa, tales como la catalasa, para evitar que el peróxido de hidrógeno se transforme en radicales hidroxilo.

### **Catalasa (CAT)**

La catalasa es una proteína compuesta de cuatro subunidades, cada una de las cuales contiene grupo hemo y la molécula de NADPH. En los mamíferos la CAT se sintetiza en la mayoría de las células. A nivel subcelular, el 80% de la actividad de la CAT se localiza en los peroxisomas y el 20% restante en el citosol. La catalasa elimina el peróxido de hidrógeno sin necesidad de un agente reductor:



### **Sistema del Glutation**

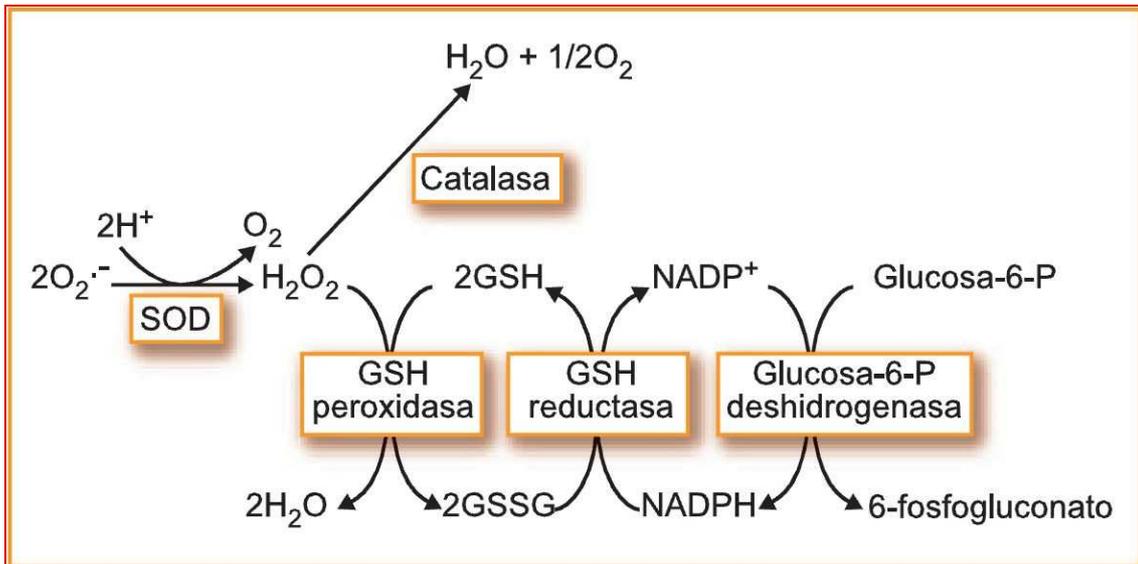
El glutatión (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteínilglicina) es un tripéptido involucrado en la defensa antioxidante de casi todas las células. Su capacidad antioxidante se debe a la presencia de un residuo de cisteína (grupo tiol -SH), capaz de formar el puente de disulfuro entre las dos moléculas de glutatión, proceso acompañado con la liberación de dos electrones y dos protones.

El glutatión puede existir en su forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG), o unido a las proteínas. Cuando la forma reducida de glutatión pasa a su forma oxidada, se liberan protones y dos electrones, los cuales pueden utilizarse para reducir el efecto dañino de los radicales libres. El enzima que participa en este proceso es la glutatión peroxidasa (GPx), y a su vez, la vía de recuperación del glutatión reducido a partir del GSSG es catalizada por el enzima glutatión reductasa (GRd). Este último es dependiente del NADPH proveniente del ciclo de las pentosas fosfato.



Las enzimas GRd y GPx juntos forman la maquinaria antioxidante dependiente de glutatión. Ambas enzimas se encuentran tanto en el citosol, como en la mitocondria, aunque predomina el componente citosólico (Kim y cols., 2003).

El sistema de glutatión es un indicador de la funcionalidad celular y puede ser medido a través del índice GSH/GSSG. En condiciones normales la forma reducida debe predominar la forma oxidada y el índice oscila entre 1 y 10 (Pastore y cols., 2003). El índice GSSG/GSH también ha sido propuesto como un índice sensible de estrés oxidativo (Toborek y Henning, 1994).



**Figura 3.** Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante. SOD: superóxido dismutasa; GSH: glutatión; GSSG: glutatión oxidado. (Gil Hernández, 2005)

#### 4.2.3. El ejercicio como fuente de estrés oxidativo.

La generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) es un proceso fisiológico que se produce como consecuencia del metabolismo celular normal. Sin embargo, la sobreproducción de RONS puede ser perjudicial para la célula oxidando estructuras celulares básicas (como los lípidos, proteínas y ADN), en un proceso conocido como estrés oxidativo (Kyparos y cols., 2009). El estrés oxidativo es una condición en la que se desestabiliza el delicado equilibrio existente entre la producción de prooxidantes (radicales libres) y el sistema de defensa antioxidante favoreciendo la expresión de los radicales libres. (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009) La inducción de especies reactivas del oxígeno (ROS) por el ejercicio físico está bien documentada en estudios en animales y humanos (Oostenbrug y cols., 1997).

Las RONS son productos fisiológicos del metabolismo aeróbico, y tienen impacto en diversos procesos metabólicos, incluyendo la expresión de genes, recambio de proteínas, reacción inflamatoria, la inmovilización del ácido araquidónico, y la diferenciación celular (Ji y colbs., 2006). Las RONS son liberadas de los músculos, células endoteliales y del sistema inmune para estimular una adaptación al ejercicio físico intenso. Esta adaptación incluye cambios en el estado inmunológico y energético relacionado con la síntesis de citoquinas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y la interleuquina 6 (IL-6) (Zembron-Lacny y colbs., 2010). El estrés oxidativo generalmente se describe como una condición en la cual la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno genera daño a macromoléculas de las estructuras celulares y subcelulares (Rodríguez y colbs., 2008). La producción exagerada de radicales libres provocada por el ejercicio ha sido documentado en sedentarios saludables (Alessio y colbs., 2000; Jammes y colbs., 2004) y en sujetos entrenados (Ortega y colbs., 2006).

En la actualidad, la determinación del estrés oxidativo debe considerarse de rutina para la valoración de pruebas físicas y seguimiento del rendimiento deportivo. Como es sabido, las fuentes específicas de radicales libres durante ejercicio incluyen principalmente la fuga de electrones desde la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, pero también de la reacción de xantina oxidasa, de la oxidación de la hemoglobina y de la activación de neutrófilos (Aguilo y colbs., 2005). El ejercicio aumenta el consumo de oxígeno, y hasta 2% de éste puede ser convertido en ROS (Nakatani y colbs., 2005). El ejercicio aumenta el consumo de oxígeno, especialmente en el músculo esquelético, en comparación con el estado de reposo. Mayor consumo de oxígeno durante el ejercicio puede aumentar la producción de los radicales libres (Martarelli y Pompei, 2009). Por lo tanto, las actividades físicas como correr, ciclismo, natación pueden causar producción de radicales libres, tanto en humanos como en animales de experimentación. Sin embargo, la producción de radicales libres inducida por el ejercicio es menor durante ejercicios de baja intensidad y no excede la capacidad antioxidante por lo que no se observa ningún daño (Pepe y colbs., 2009). En este sentido, el entrenamiento de resistencia, bien tolerado, a intensidades por debajo del 60% de consumo máximo de oxígeno (VO<sub>2</sub>max), mejora la capacidad antioxidante de la sangre medida en reposo, así como durante el ejercicio, probablemente debido a la exposición al estrés oxidativo (Brites y colbs., 1999).

Por el contrario, el ejercicio intenso de larga duración y el entrenamiento exhaustivo pueden sobrepasar nuestra capacidad para desintoxicar la acción de especies reactivas del oxígeno en las células sanguíneas. Hay datos suficientes en los diversos estudios realizados para sugerir que el estrés oxidativo, el daño muscular y la inflamación son eventos asociados durante el ejercicio (Serrano y cols., 2010).

Está demostrado que el principal factor responsable del daño oxidativo durante el ejercicio es el aumento en el consumo de oxígeno. Sin embargo, otros factores tales como la acidosis (Siesjo y cols., 1985), la auto-oxidación de las catecolaminas (Cohen y Heikkila, 1974) y el síndrome de isquemia/reperfusión también inducen daño oxidativo durante la realización de ejercicio anaeróbico supramáximo. Los cambios en los sistemas antioxidantes plasmáticos, sea por inducción de su síntesis o por su depleción, suelen reflejar la producción incrementada de los radicales libres ocasionados por ejercicio en el músculo activo, lo cual demuestra a su vez, la potencialidad de daño a macromoléculas. En ocasiones no se encuentran modificaciones en los niveles circulantes de uno o varios componentes antioxidantes, lo cual está determinado por la eficiencia del resto de los componentes antioxidantes y por la magnitud de la producción de los radicales libres, que a su vez depende de las características del ejercicio físico realizado. Por ejemplo, después de 45 minutos de carrera o 90 minutos de bicicleta a intensidad submáxima, no se reportaron cambios en los niveles plasmáticos de vitamina E (Meydani y cols., 1993; Viguie y cols., 1993).

Está claro que la determinación aislada de un solo antioxidante no refleja la dinámica de los sistemas endógenos de defensa antioxidante. La medición del sistema de glutatión suele aportar información valiosa para la interpretación del balance entre la producción de radicales, la capacidad de respuesta antioxidante y la variabilidad de daño a macromoléculas. El músculo esquelético se ha identificado recientemente como un órgano que produce y libera citoquinas, a las que le han llamado “mioquinas” Teniendo en cuenta que el músculo esquelético es el mayor órgano del cuerpo humano, el descubrimiento de que la contracción del músculo esquelético segrega proteínas establece un nuevo paradigma: El músculo esquelético es un órgano endocrino que produce y libera mioquinas en respuesta a la contracción, lo que puede influir en el metabolismo de otros tejidos y órganos (Pedersen, 2009). Con el descubrimiento de que el ejercicio provoca un aumento de una serie de citoquinas, se estableció un posible vínculo entre la actividad contráctil del músculo esquelético y cambios inmunológicos (Pedersen y Febbraio, 2008). Algunos estudios contrastan el rol oxidativo y pro-

inflamatorio del ejercicio. La elevación de IL-6 inducida con el ejercicio está bien correlacionada con el lactato plasmático, la creatina quinasa y los marcadores de estrés oxidativo, pero estas asociaciones disminuyen con el envejecimiento.

Los resultados apuntan a resaltar que la carga y dosificación del ejercicio son importantes determinantes de la respuesta de las citoquinas y del sistema de defensa antioxidante a la sobreproducción de radicales libres. TNF $\alpha$  e IL-1 estimulan la producción de IL-6, esta última clasificada tanto como citoquina pro-inflamatoria y anti-inflamatoria (Tilg et al, 1997).

El ejercicio y el entrenamiento físico tienen implicaciones en el rendimiento, en el estado cardiovascular e inmunológico, las cuales están mediadas al menos en parte por sus consecuencias en el estrés oxidativo, el daño muscular y la inflamación. El entrenamiento físico, definido como un conjunto de actividades y ejercicios de periodicidad, ritmo y carga pre-establecidas, orientado generalmente al mejoramiento del rendimiento, las capacidades, la salud y el bienestar en general, tiene por tanto potenciales consecuencias en la producción de radicales libres, en la eficiencia de los sistemas enzimáticos antioxidantes y la mediación de señales inflamatorias. El ejercicio intenso ocasiona daño muscular independientemente del estado de entrenamiento (Venditti y Di, 1997). Numerosos estudios sustentan el estrés oxidativo generado por el ejercicio. Por ejemplo, el estrés oxidativo elevado, el cual está indicado entre otros, por niveles elevados de malonaldehído, fue observado en corredores maratonistas y sprinters, al comparárseles con grupos controles bajo las mismas condiciones de reposo (Schippinger y colbs., 2002). Además, el ejercicio prolongado en maratonistas se acompaña de elevaciones plasmáticas significativas de dienos conjugados (Marzatico y colbs., 1997). Estas evidencias sugieren que tanto el ejercicio intenso de larga duración como el entrenamiento explosivo exceden la capacidad del individuo de desintoxicarse de los radicales libres.

En cambio, también hay estudios que sugieren que el entrenamiento regular de moderada intensidad parece ayudar en términos fisiológicos a la regulación del estado redox celular. Tal es el caso demostrado de acondicionamiento miocárdico al estrés oxidativo prolongado inducido con el entrenamiento, debido que favorece un proceso de adaptación que aumenta la resistencia a los radicales libres (Radak y colbs., 2000), lo cual es beneficioso para el sistema inmune. Los mecanismos potenciales implicados en las alteraciones oxidativas inducidas por el ejercicio son las siguientes: se eleva del consumo de oxígeno en reposo, baja la disponibilidad de oxígeno inducida por las

restricciones en el flujo sanguíneo local y ocurre depresión en la sensibilidad del ADP a la respiración mitocondrial. Todos estos cambios producen disminución de la fuerza isométrica e isocinética, menor potencia, aumento en la producción de lactato y elevación de la respuesta cronotrópica al ejercicio submáximo, pero se hacen menos notorias a la misma carga de esfuerzo cuando la realizan personas entrenadas.

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

La peroxidación lipídica es una consecuencia nefasta de los radicales libres que no son depurados eficientemente por los sistemas endógenos de defensa antioxidante. Las proteínas de membrana se entrecruzan y disminuye la movilidad de la membrana (Schippinger et al, 2002). Entre otras consecuencias aparece el 4-hidroxinonal, un metabolito producido de la peroxidación lipídica, considerado agente depletante de glutatión y citotóxico porque inhibe el ciclo celular (Wonisch y colbs., 1998) . Debido a la sencillez y a la precisión de la determinación de metabolitos secundarios y a la validez confirmada de la peroxidación lipídica como indicador de daño a macromoléculas, en esta investigación medimos los niveles plasmáticos de malonaldehído como marcador biológico de estrés oxidativo. La peroxidación también repercute en las lipoproteínas, por lo tanto inducen aterogenicidad. Por ejemplo, se demostró un aumento significativo del 78% en la susceptibilidad de la peroxidación lipídica de los ciclistas que compitieron 95 km en Sierra Nevada (Ruiz y colbs., 2006). Hay que destacar que existen considerables diferencias del grado de peroxidación lipídica entre modalidades deportivas. Los nadadores por ejemplo, tienen mejores perfiles lipídicos que los futbolistas y jugadores de voleibol, teniendo estos últimos elevados cocientes aterogénicos (Ruiz y colbs., 2004) Estas alteraciones lipídicas están

probablemente relacionadas con un desbalance en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias.

## **5. Estrés oxidativo/nitrosativo y la protección antioxidante durante el ejercicio físico.**

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, el estrés oxidativo y nitrosativo y el ambiente forman una compleja relación que influyen en la salud humana y la enfermedad. Las moléculas están expuestas a una gran cantidad de especies oxidantes y nitrosantes en los sistemas biológicos. Sus interacciones con las principales clases de biomoléculas (ácidos nucleicos, lípidos y proteínas) generan múltiples productos nocivos para la integridad funcional de los compartimentos celulares. La generación descontrolada de las especies reactivas produce disturbios en el estado redox, tales que alteran la información genética, desnaturaliza las proteínas, inactiva enzimas y desordena los sistemas de biomembranas, ocasionando enfermedad, envenenamiento y envejecimiento. La huella del daño inducido por las especies reactivas puede proveer evidencia de la naturaleza del ataque oxidante. La hipótesis de biomarcadores oxidativos propone que la medición de los niveles de oxidación y nitrosación de las biomoléculas puede proporcionar un índice de los niveles de exposición de los sistemas biológicos (Griffiths, 2002).

Para contrarrestar los efectos de la exposición al daño por radicales libres, se tiene claro en la actualidad que la intervención en los estilos de vida de las personas, incluyendo el ejercicio físico, la nutrición y la eliminación del hábito de fumar pueden cooperar positivamente para reforzar el sistema de defensa antioxidante. El ejercicio físico es una actividad implícita de la vida humana. El cambio biológico más notable que sucede durante el ejercicio es el aumento en la tasa metabólica, el cual está acompañado por un reforzamiento en la tasa de consumo de oxígeno. Esta elevada tasa de flujo de oxígeno a través de la mitocondria provoca incremento en la fuga de electrones, lo cual impone estrés a las organelas. La sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) asociadas con el ejercicio físico contribuyen al daño tisular. Por otro lado, durante el envejecimiento aumenta la producción de ROS/RNS y disminuye la eficiencia del sistema de defensa antioxidante. Se deduce por lo tanto, que las personas envejecidas son especialmente vulnerables al estrés inducido por el ejercicio físico.

Los radicales libres reaccionan rápidamente con las membranas biológicas debido a la abundancia de lípidos poli-insaturados. El hierro y cobre presentes en las membranas facilitan la tasa de peroxidación lipídica. Por definición, la peroxidación altera la estructura, la fluidez y la permeabilidad relativa de la bicapa lipídica. La peroxidación lipídica es una fuente importante de productos citotóxicos tales como los aldehídos producidos de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos. Estos aldehídos son biológicamente activos. Por ejemplo, 4-hidroxinonenal, un producto de la oxidación de ácido araquidónico, es citotóxico y mutagénico. Los aldehídos son capaces de formar puentes cruzados entre proteínas, inactivando enzimas y transportadores de membrana. Una manera de contribuir con la desintoxicación de estos productos es mediante la oxidación de MDA a través de aldehído deshidrogenasa mitocondrial. Dependiendo de la carga y duración del ejercicio físico, éste puede generar la producción adicional de radicales libres para el ataque lipídico. Por otro lado, el entrenamiento puede mejorar la respuesta antioxidante a la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio y la suplementación con antioxidantes tales como melatonina y, en cierto grado la vitamina E, pueden reducir la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio. La protección antioxidante adecuada es crucial para que la célula evite el daño ocasionado por las especies reactivas.

El ejercicio aeróbico extenuante está asociado con la sobreproducción de especies reactivas en el músculo esquelético, el hígado y el corazón (Davies y cols., 1982) En estas circunstancias, las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa proveen la defensa primaria contra las especies reactivas de oxígeno generadas durante el ejercicio. Las actividades de estas enzimas aumentan en respuesta al ejercicio en estudios humanos y de animales. Cuando la duración del ejercicio es relativamente corta (hasta varias horas), el aumento en la actividad catalítica es debido a las modificaciones alostéricas de las moléculas enzimáticas ya existentes y/o por mecanismos covalentes, mas no por inducción de la síntesis de nuevas proteínas enzimáticas (Ji y cols., 1992) Debido al amplio rango de actividad enzimática y a los variables niveles de producción de las especies reactivas en los diferentes tejidos, es variable también la respuesta de la defensa al ejercicio y la magnitud del insulto oxidativo/nitrosativo. Un episodio agudo de ejercicio aumenta la actividad de la cobre/zinc-superóxido dismutasa (CuZn-SOD), mas no la actividad de la manganeso-superóxido dismutasa (Quintanilha y Packer, 1983). Debido a que CuZn-SOD tiene una rápida tasa de recambio y una vida media corta (en el rango de minutos), no se puede

descartar completamente que la síntesis de nueva proteína contribuya con la respuesta de la enzima al ejercicio que dura algunas horas.

La actividad de glutatión peroxidasa (GPx) tiene respuestas variables al episodio agudo de ejercicio en el músculo esquelético. Es posible que las discrepancias estén relacionadas con la intensidad del ejercicio. El otro componente esencial de la defensa antioxidante lo constituye el sistema del glutatión. La razón de glutatión /disulfuro (GSH/GSSG) depende de la utilización y el transporte celular. La utilización de GSH se controla por las enzimas GPx y glutatión reductasa (GRd) y el transporte es controlado por las enzimas del ciclo  $\gamma$ -glutamil. Además, el ATP y el NADPH son determinantes del estado redox. El ejercicio aeróbico intenso aumenta la producción de radicales libres y reduce las concentraciones intracelulares de ATP y NADPH debido a la mayor demanda metabólica ocasionada por la actividad muscular. Estos eventos pueden disminuir la capacidad para regenerar GSH a partir de GSSG. Hay numerosas evidencias que indican que un episodio agudo de ejercicio físico extenuante aumenta significativamente el contenido de GSSG en el músculo esquelético (Ji y cols., 1992). En cambio, cuando el ejercicio de intensidad moderada es prolongado, no suele ocurrir acumulación de GSSG, lo cual se explica por un lado, debido a la estimulación simpática que genera la salida continua de GSH hepático hacia la sangre y luego al músculo. La otra explicación es la inducción de las enzimas que controlan la utilización y el transporte de GSH en respuesta al ejercicio moderado y prolongado.

Otro factor determinante del nivel de GSH en el plasma y el músculo esquelético durante el ejercicio físico es la magnitud de la reserva hepática de GSH. Durante el ayuno, disminuye proporcionalmente el contenido hepático de GSH. En cambio, la dieta rica en cisteína aporta sustrato para la síntesis de GSH. A pesar de lo anteriormente señalado, la suplementación con GSH exógeno durante el ejercicio tiene poca repercusión en sus niveles sanguíneos y musculares, ya que ejerce una fuerte inhibición por retroalimentación sobre la glutamilsteína sintetasa, la cual es la enzima catalizadora de la formación del enlace peptídico inicial entre cisteína y glutamato. Por otro lado, las vitaminas antioxidantes y otros antioxidantes de bajo peso molecular desempeñan también un rol importante en la depuración de radicales libres durante el ejercicio agudo. A diferencia del sistema antioxidante endógeno, los niveles de estos antioxidantes exógenos no están estrictamente regulados, razón por la cual cambian drásticamente con el ejercicio.

La deficiencia de vitamina E exagera la producción de radicales libres, la peroxidación lipídica y la disfunción mitocondrial en el ejercicio extenuante. Una de las principales funciones antioxidantes de la vitamina C es el reciclaje de la vitamina E. Sin embargo, las altas dosis de vitamina C pueden generar actividad pro-oxidante ya que el ascorbato reacciona con metales iónicos de transición, transformándoles en hidroxilos y otras especies reactivas. Aunque faltan datos para conocer las interacciones de ubiquinona con otros antioxidantes durante el ejercicio, la dieta elevada en ubiquinona ocasiona mayor resistencia a la peroxidación lipídica inducida por hidroperóxido. De todas formas, está claro hoy en día que los suplementos exógenos de la mayoría de los antioxidantes (vitaminas, etc.) inhiben la respuesta del sistema antioxidante endógeno, lo que da lugar a un aumento del estado redox.

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de purina y aparece en grandes concentraciones en la circulación después de la contracción muscular intensa, debido a la excesiva degradación de nucleótidos de adenina ocasionada por la falta de ATP intramuscular. Estos metabolitos purínicos son liberados desde el músculo hacia la sangre y una porción de estos componentes son convertidos en ácido úrico mediante xantina oxidasa de las células endoteliales vasculares. El ácido úrico es un potente antioxidante que depura los radicales hidroxilos y ayuda a preservar los niveles plasmáticos de ascorbato. Por otro lado, el ácido lipoico es un cofactor de la descarboxilación oxidativa catalizada por cetoácido deshidrogenasas. Su forma reducida, el ácido dihidrolipoico, tiene potencial antioxidante porque depura radicales superóxido, hidroxilo, peróxido e hipocloroso, entre otros. También es un agente quelante de metales iónicos de transición y es capaz de regenerar a las vitaminas E y C, directa e indirectamente mediante la vía del ciclo GSH-GSSG. Además, el ácido dihidrolipoico ejerce un efecto inductor en la expresión de las enzimas antioxidantes mediante la regulación del factor NF- $\kappa$ B, particularmente por la disociación de la subunidad reguladora I $\kappa$ B del complejo NF- $\kappa$ B y de la activación de NF- $\kappa$ B (p50 y p65) al ADN.

El entrenamiento físico induce los enzimas antioxidantes, lo cual disminuye la susceptibilidad del individuo al estrés oxidativo. El ejercicio físico regular ayuda a prevenir enfermedades cardiovasculares, en parte debido a que el entrenamiento también induce las enzimas del metabolismo de las lipoproteínas. Los sujetos entrenados tienen mayores actividades de la lipoproteína lipasa y de la lecitina colesterol acil transferasa. Consecuentemente, las disminuciones de las concentraciones plasmáticas de

triglicéridos, lipoproteína de baja densidad (LDL-colesterol), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL-colesterol) y el incremento de lipoproteína de alta densidad (HDL-colesterol) están estrechamente relacionados con el ejercicio.

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

El principal componente de la respuesta antioxidante al entrenamiento es la inducción de enzimas antioxidantes, el cual suele acompañarse de una respuesta inflamatoria. Aunque el entrenamiento puede disminuir las reservas antioxidantes no enzimáticas, la célula activa la síntesis de novo de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. El cambio adaptativo más consistente ha sido reportado en la glutatión peroxidasa mitocondrial (Ji y cols., 1992), debido a su mayor sensibilidad a los niveles intracelulares de radicales libres. En humanos, la inducción enzimática antioxidante se correlaciona directamente con el consumo de oxígeno y la carga del entrenamiento. Las adaptaciones del sistema de glutatión al entrenamiento están relacionadas con la utilización y la capacidad celular para la captación de glutatión reducido. En comparación con las personas no entrenadas, las entrenadas generalmente demuestran mayor tolerancia a las variaciones sanguíneas de GSH inducidas por ejercicio. Suele haber mayor concentración plasmática de GSH en jóvenes y adultos mayores entrenados respecto a personas sedentarias debido a la elevada tasa de exporte hepático de glutatión reducido. La intensidad y duración de la actividad contráctil determina en gran medida la magnitud de la señalización mitocondrial. Estas señales involucran la activación o inhibición de factores transcripcionales, la activación o inhibición de los factores de estabilidad de mRNA que median los cambios en la degradación de mRNA, alteraciones en la eficiencia traduccional, las modificaciones post-trasduccionales de las proteínas, los cambios en la cinética de transporte de

proteínas de importe y las alteraciones en la tasa de plegamiento y ensamblaje de proteínas para la formación de multicomplejos.

## **6. Monitorización del entrenamiento físico deportivo.**

El objetivo del entrenamiento deportivo es hacer que el cuerpo se adapte a un estímulo intenso, elevar la capacidad de los diversos sistemas para realizar altas cargas de trabajo, y por lo tanto, mejorar el rendimiento (Smith y Roberts, 1994). En teoría, debe mantenerse un equilibrio entre la carga de trabajo y los periodos de descanso suficientes en un régimen de entrenamiento exitoso. Los atletas que realizan un volumen de entrenamiento de alta intensidad y con pocos períodos de descanso puede experimentar un desequilibrio entre el esfuerzo global durante el programa de entrenamiento y su tolerancia para realizar tal esfuerzo, lo que puede llevar a la extralimitación o sobreentrenamiento (Urhausen y cols., 1995) , que se caracteriza por una disminución en el rendimiento, fatigabilidad acelerada, síntomas subjetivos de estrés e inflamación transitoria (Margonis y cols., 2007). Por lo tanto, es muy valioso evaluar integralmente el estado físico y la adaptación de un atleta para poder dirigir su programa de entrenamiento, prevenir los trastornos antes mencionados y la mejora del rendimiento. Durante un programa de entrenamiento, no existe un método universal disponible para el diagnóstico y seguimiento. Aunque muchos parámetros incluyen el comportamiento y marcadores biológicos no invasivos; los marcadores bioquímicos , hormonales e inmunológicos se han estudiado para evaluar el estado físico de los atletas , la fatiga aguda y el sobreentrenamiento (Lac y Maso, 2004). Esto demuestra la necesidad de una intervención multidisciplinaria, ya que aún se desconoce el límite real entre la adaptación bioquímica al ejercicio y el comienzo del sobreentrenamiento (Siegel y cols., 1997).



## ***II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

## *Hipótesis y Objetivos*

## **Hipótesis**

Los sistemas de defensa del organismo muestran plasticidad, es decir, deben de adaptar su respuesta ante un estímulo crónico elevado, permitiendo una función adecuada del mismo.

Por ello, los deportistas de alta competición, bien entrenados, tienen que responder al ejercicio intenso y adaptar su organismo para contrarrestar adecuadamente el estrés oxidativo, inflamatorio y metabólico producidos por dicha actividad física, para mantener e incluso mejorar sus capacidades.

## **Objetivo general**

Evaluar los cambios en el perfil metabólico, endocrino, oxidativo e inflamatorio de jugadores profesionales de balonmano a lo largo de un año de competición y relacionarlo con el grado de actividad física.

## **Objetivos específicos**

1°. Determinar los cambios en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, mediante la determinación plasmática de colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicéridos y glucosa.

2°. Valorar la función renal y equilibrio electrolítico, mediante la medida de ácido úrico, urea, creatinina, potasio, sodio y cloruro.

3°. Evaluar el grado de daño muscular midiendo los niveles plasmáticos de LDH, CK, y mioglobina, así como la respuesta endocrina al estrés por los niveles de cortisol y testosterona.

4°. Determinar los cambios en el estado inflamatorio mediante la determinación de los niveles de citoquinas proinflamatorias plasmáticas IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ .

5°. Medir el estado redox y la capacidad antioxidante de los jugadores mediante el análisis de los niveles de nitritos y lipoperóxidos en plasma, y de las concentraciones eritrocíticas del cociente GSH/GSSG, y la actividad de GPx y GRd

## *Hipótesis y Objetivos*

### ***III. SUJETOS Y MÉTODOS***



## **1. Sujetos de estudio.**

Para este estudio se ofrecieron voluntariamente y firmaron el correspondiente consentimiento informado 16 jugadores profesionales de la Liga Española de Balonmano durante la temporada de 2008-2009. Los jugadores tenían una media de edad de  $22.7 \pm 3.1$  años; altura  $187 \pm 5.6$  cm, y un peso de  $86.8 \pm 5.5$  kg. El estudio se aprobó por el Comité de Ética de la Universidad de Granada y se llevó a cabo de acuerdo con las normas éticas establecidas en la Declaración de Helsinki de 1964, ratificada por la 29th World Medical Assembly, Tokio 1975 y su última revisión en 2008. Todos los participantes eran jugadores altamente entrenados con una práctica media de  $10 \pm 2$  años y realizaban ejercicio físico diariamente. Los sujetos del estudio pasaron un estricto control médico en el que se descartó cualquier patología que pudiera afectar la práctica deportiva de nivel intenso. La ingesta energética diaria de los jugadores fue de 3300 Kcal, con un perfil calórico de 17% de proteínas (142.3 g/día), 34% de grasas (126.7 g/día) y 49% de hidratos de carbono (399.7 g/día). El objetivo de este entrenamiento fue específicamente la competición. Los participantes se prepararon para la Liga Española de balonmano 2008-2009. El estudio se realizó entre agosto de 2008 y agosto de 2009.

## **2. Diseño del entrenamiento.**

Los jugadores de balonmano se evaluaron desde la tercera semana de agosto de 2008 hasta la cuarta semana de abril de 2009, el período correspondiente a la liga española de balonmano. El plan de entrenamiento se basó en los modelos de Seirul-lo (Seirul-lo Vargas, 1998) y Verjoshansky (Verjoshanski, 1990), y se estructuró en macrociclos - mesociclos - microciclos - sesiones. El macrociclo es la mayor unidad de tiempo que incluye 4,5 meses; cada mes corresponde a un mesociclo, y cada mesociclo se divide en cuatro microciclos de una semana con promedio de 15 horas de entrenamiento cada uno, dando un total de 36 microciclos (Tabla 2). Todo el período de entrenamiento y competición, se dividió en dos macrociclos I y II. Los entrenamientos incluyeron cinco sesiones por semana, de las 20:30 a las 23:30 h (de lunes a viernes), y un partido de balonmano el sábado, de acuerdo con el calendario de competición. El nivel de dificultad de cada partido durante la liga se puntuó de 1 a 5, que corresponde un valor de 1-2 para un partido amistoso, y de 3-5 para partidos difíciles.

Los ciclos de la temporada de entrenamiento y competición se distribuyeron de la manera siguiente:

1) macrociclo I: contiene un microciclo inicial de entrenamiento gradual con un volumen de carga alto (150%-200% del usado normalmente) y de media a baja intensidad (30%-50 % del máximo). A este microciclo inicial le siguió otro microciclo de alta intensidad (carga de choque), alcanzando el 100% de la intensidad máxima con un volumen de carga baja (50%); este tipo de microciclo se repitió una semana después. El resto de los microciclos se diseñaron para aumentar progresivamente la actividad física, alcanzando el valor máximo en el microciclo 16 (Fig. 4). La carga aplicada durante estos microciclos era elevada, cerca de la intensidad máxima (80%), con un volumen de carga media de 60%-70%. Por lo tanto, los objetivos de este macrociclo fueron conseguir resistencia aeróbica, capacidad aeróbica máxima, y fuerza muscular máxima. El macrociclo I finalizó con dos microciclos de mantenimiento físico, con tareas de aprendizaje para mejorar las habilidades de los jugadores, incluido el espíritu de equipo y juego en equipo. La intensidad aplicada en este período de mantenimiento no excedió del 80% de la carga máxima.

2) macrociclo II: se inicia con un microciclo de entrenamiento suave y seis microciclos de mantenimiento físico, con características similares a las descritas en el macrociclo I. Los siguientes 11 microciclos se caracterizaron principalmente por un entrenamiento de 80% de intensidad máxima con un 60% -70% en volumen de carga y aprendizaje. Los objetivos de este segundo macrociclo de gran intensidad y moderado volumen fueron mantener la potencia aeróbica máxima, la velocidad de competencia, y alcanzar el mejor juego de equipo.

Dentro de los macrociclos I y II se ubicaron microciclos de recuperación y control. Estos microciclos se utilizan para la recuperación de los jugadores después de semanas de carga. El objetivo de este tipo de microciclos es que los sujetos puedan adaptarse a las cargas a que son sometidos, mientras que al mismo tiempo, desde un punto de vista psicológico, se muevan lejos del estrés de la competición. Los microciclos de control corresponden a los períodos en que los sujetos son evaluados. Por esta razón, el volumen se reduce al 30% y sólo se llevan a cabo pruebas físicas y técnicas. Esta información es utilizada para analizar el progreso de su condición física y sus capacidades de coordinación en el juego.

Tabla 2. Estructura de entrenamiento y competición de la temporada 2008-2009

MACROCICLO 1 (20/08/2008 - 4/01/2009)																MACROCICLO 2 (5/01/2009 - 26/04/2009)										DESCANSO (10/8/2009)															
MESOCICLOS																																									
1				2				3				4				5				6		7		8		9		10													
MICROCICLOS																																									
01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36						
G	C	C	C	C	C	C	R	C	C	R	C	C	C	C	R	A	A	R	A	A	A	A	R	A	C	C	C	A	A	A	C	A	C	A	A						
R	G	G	C	G	G	G	C	G	G	C	G	G	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	G	G	R	C	C	C	R	C	R	G	C						
INTENSIDAD DE LOS PARTIDOS																																									
1				3				5				5				2				3		3		5		2		5				5		4		5		3		5	
entrenamiento gradual inicial+ entrenamiento progresivo de alta intensidad (IP = 39)																mantenimiento físico (Aprendizaje) (IP = 27)						entrenamiento de moderado a alto + aprendizaje (IP = 36)																			
																																									
DIAS DE TOMA DE MUESTRAS																																									
M1				M2				M3				M4				M5				M6				M7																	

GR = Gradual, CG = Carga, CGC = Carga + Competición, AC = Aprendizaje + Competición, R = Reposo, RC = Recuperación y Control, CGA = Carga + Aprendizaje, CR=Competición + Recuperación, CGR = Carga + Recuperación, CRC = Competición + Recuperación + Control, M1=20/08/2008, M2=08/10/08, M3=29/10/08, M4=03/12/08, M5=28/01/2009, M6=26/03/2009, M7=10/08/2009



El macrociclo es la unidad mayor de tiempo de entrenamiento que incluye cinco meses de duración; cada mes sería un mesociclo y cada mesociclo se divide en microciclos de una semana de duración. El año de competición se dividió en: pretemporada, etapa de competición y etapa de descanso. La estructura básica utilizada en la planificación fue el microciclo en sus diferentes formas. Dentro de cada etapa existen diferentes modelos de microciclos como unidad básica del entrenamiento, tales como: microciclos de recuperación, microciclos de aprendizaje, microciclos de competición, microciclos de control y microciclos de carga. En los microciclos de recuperación el deportista se recupera a nivel psíquico y físico con sesiones de masaje, estiramientos y relajación. Los microciclos de aprendizaje se utilizan al inicio de la pretemporada y en momentos puntuales de la misma para asentar los conocimientos. En los microciclos de competición lo principal es adaptarse al rival. La intensidad es muy alta, la especificidad es también muy alta y el volumen es relativamente bajo. El microciclo de control es utilizado para la evaluación de las diferentes cualidades físicas que se están trabajando. Podremos controlar de forma objetiva la evolución de los jugadores a lo largo de la temporada aplicando este tipo de microciclos. Los microciclos de carga son utilizados principalmente en momentos de pretemporada en los que todos los factores que influyen en el rendimiento se tienen que trabajar a un nivel más general. Durante las sesiones de entrenamiento se realizaron ejercicios de ataque, ejercicios de contraataque, ejercicios de defensa, simulacro de partidos, etc.

### **3. Evaluación de la actividad física.**

El método utilizado para estimar la actividad física o carga interna desarrollada por el deportista fue la escala de percepción subjetiva del esfuerzo de Borg (RPE) "Rating of perceived exertion" (Borg, 1962). La escala de la RPE es una forma de estimar la carga, que ha sido muy utilizada por múltiples autores tanto en deportes colectivos como en deportes individuales. La escala de 15 puntos, creada por Borg (Borg, 1990), va desde 6 hasta 20 puntos, donde 6 equivale a ningún esfuerzo ejercido, 7 es extremadamente ligero, 9 es muy ligero, 11 es ligero, 13 es un poco duro, 15 es duro, 17 es muy duro, 19 es extremadamente duro y 20 es el máximo esfuerzo. Si multiplicamos el número resultante por 10, tendremos un valor aproximado a la frecuencia cardíaca del sujeto durante el ejercicio en cuestión (Cuadrado Reyes, 2010).

#### **4. Toma y preparación de las muestras.**

Se extrajeron aproximadamente 15 ml de sangre de la vena antecubital a los sujetos en reposo entre las 7-8 horas am con 8-10 horas de ayuno previo, durante los microciclos de recuperación y control. Durante el año de competición (2008-2009) se realizaron siete muestreos. En 2008 se recogieron muestras de sangre el 20 de agosto, 8 de octubre, 29 de octubre y 3 de diciembre, y en 2009 se recogieron el 28 de enero, 26 de marzo y el muestreo del 10 de agosto que se hizo fuera de la temporada cuando los jugadores regresaban de sus vacaciones. Las muestras de sangre se obtuvieron en 3 vacutainers con EDTA-K<sub>2</sub> y en un tubo adicional para la obtención de suero, colocándose inmediatamente en hielo hasta su centrifugación a 3.000 g durante 10 min a 4° C. A continuación se separó la fracción de plasma y suero en varias alícuotas. La fracción de eritrocitos, se lavó y centrifugó tres veces con una solución de cloruro de sodio a 0.9% en frío. Las alícuotas de eritrocitos, plasma y suero se congelaron a -80° C hasta el posterior análisis de los marcadores de estrés oxidativo y citoquinas, y otra alícuota de suero se mantuvo a 4° C para el análisis bioquímico de rutina, dentro de las 12 horas de la extracción en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Los cambios metabólicos se evaluaron mediante la medida de las concentraciones séricas de colesterol, HDL-colesterol, VLDL, triglicéridos, glucosa, creatinina, urea y ácido úrico. También se midieron en suero sodio, potasio, y cloruro. Se evaluó la función hepática midiendo la actividad sérica de la AST y ALT. La respuesta al estrés se determinó mediante los niveles de cortisol y testosterona. Como marcadores de daño muscular se usaron la CK, LDH y mioglobina. El daño oxidativo e inflamatorio se evaluó mediante la medida en plasma de los niveles de LPO, NOx, y citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$ , y TNF $\alpha$ ). El estrés oxidativo intracelular se valoró mediante la medida en eritrocitos de las actividades de la GPx y GRd, así como el cociente GSSG/GSH. Las medidas en eritrocitos se expresaron por g de Hb.

## **5. Métodos.**

### **5.1. Técnicas y procedimientos empleados.**

#### **5.1.1. Determinación del perfil metabólico, renal, y daño muscular de los jugadores.**

Los parámetros bioquímicos en todas las muestras se analizaron dentro de las 12 horas siguientes a la extracción en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada utilizando los métodos de rutina. Los cambios del metabolismo lipídico se evaluaron mediante las concentraciones séricas ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1}$ ) de colesterol, HDL-colesterol, y triglicéridos, así como los índices de riesgo aterogénico, CT/HDL y LDL/HDL. Los niveles de VLDL-colesterol y LDL-colesterol se calcularon de acuerdo a la ecuaciones de Friedewald:  $[\text{VLDL-colesterol} = \text{triglicéridos}/5]$  y  $[\text{LDL-colesterol} = \text{colesterol total} - (\text{HDL-colesterol} + \text{VLDL-colesterol})]$  (Burtis et al., 2006) Los niveles plasmáticos de glucosa ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1}$ ) se utilizaron como marcadores del metabolismo de hidratos de carbono.

La función renal se evaluó mediante la medida de las concentraciones séricas de creatinina ( $\text{mg} \times \text{dl}^{-1}$ ) como un indicador de la tasa de filtración glomerular y/o insuficiencia renal. Las medidas de urea y ácido úrico se usaron como indicadores de deterioro de la función excretora de los riñones y/o aumento de catabolismo. También se midieron los electrolitos sodio, potasio y cloruro ( $\text{mEq} \times \text{l}^{-1}$ ) como marcadores de hidratación.

Se evaluó la función hepática mediante la determinación de la actividad sérica ( $\text{U} \times \text{l}^{-1}$ ) de la aspartato aminotransferasa (AST) como marcador no específico de lesiones del parénquima hepático y la alanina aminotransferasa (ALT) como marcador específico. Se midieron concentraciones séricas de hormonas de estrés como cortisol ( $\mu\text{g} \times \text{dl}^{-1}$ ) y testosterona ( $\text{ng} \times \text{ml}^{-1}$ ).

Para el daño muscular se usaron las actividades séricas ( $\text{U} \times \text{l}^{-1}$ ) de creatina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH) y mioglobina ( $\text{ng} \times \text{ml}^{-1}$ )

### **5.1.2. Determinación de marcadores de estrés oxidativo.**

Para ello se utilizaron diferentes marcadores en plasma y en eritrocitos. El daño oxidativo a membranas celulares se valoró por la medida de los niveles plasmáticos de LPO, mediante la determinación espectrofotométrica de malonaldehído y 4-hidroxi-alquenos (Esterbauer y Cheeseman, 1990). La medida de lipoperoxidación se hace en base a las determinaciones de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenal (4-HDA) que proveen un índice conveniente de la peroxidación lipídica. Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen formando compuestos carbonilos. Los ácidos grasos poliinsaturados forman MDA y 4-HDA en condiciones de oxidación (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Para su determinación, se utiliza el kit Bioxytech LPO-586 (Oxis Research, Portland, OR, USA). El kit contiene un reactivo cromógeno (N-metil-2-fenilindol) que reacciona con MDA y 4-HDA a 45° C formulándose un cromóforo estable con máximo de absorbancia a 586 nm. Los resultados se expresan en nmol MDA+4HDA/ml plasma.

El estrés oxidativo intracelular se valoró por la determinación en eritrocitos del cociente GSH/GSSG por fluorescencia (Hissin y Hilf, 1976), así como por la medida espectrofotométrica de las actividades de la GPx y GRd (Jaskot y cols., 1983).

El glutatión en su forma reducida y oxidada se determina mediante un ensayo fluorimétrico que utiliza el O-ftalaldehído como reactivo de fluorescencia (Hissin y Hilf, 1976). El GSH reacciona específicamente con el O-ftalaldehído (OPT) a un pH de 8.0, formando un producto altamente fluorescente que puede ser activado a 350 nm con un pico de emisión a 420 nm. La reacción depende del pH final porque la intensidad de fluorescencia disminuye por debajo de pH 8.0, mientras que por encima causa la conversión de GSH a GSSG.

Por su parte, el GSSG reacciona específicamente con el OPT a un pH de 12.0, conduciendo a la formación de un producto altamente fluorescente que puede detectarse a una longitud de onda de emisión de 350 nm y emisión de 420 nm. La reacción depende del pH 12 porque la intensidad de fluorescencia muy por debajo de este pH se deberá al GSH que podría formarse por acción de la GRd. Para que esto no ocurra se inhibe la GRd que pudiera estar presente en la muestra con N-etil-maleimida (NEM). Tanto el GSH como el GSSG se expresaron en  $\mu\text{mol/g Hb}$ .

Con respecto a la determinación de las enzimas del ciclo del GSH, la actividad de la GPx y GRd se determina también espectrofotométricamente. Existen dos tipos de

GPx, una dependiente de selenio (Se-GPx) y otra independiente de selenio (iSe-GPx). Ambos tipos pueden usar hidroperóxidos orgánicos (cumeno hidroperóxido) como sustratos, pero solo la Se-GPx es capaz de utilizar la forma inorgánica ( $H_2O_2$ ) (Lawrence y Burk, 1976). Se utiliza la reacción acoplada con GRd para reducir el GSSG producido por la reducción de peróxidos orgánicos por medio de GPx, y el hidroperóxido de cumeno como sustrato (Jaskot y cols., 1983). El método empleado consiste en la determinación espectrofotométrica indirecta de consumo de NADPH, midiendo el descenso de la absorbancia en función de tiempo a una longitud de onda de 340 nm. Las actividades de GPx y GRd se expresan en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb}$ .

### **5.1.3. Determinación del estado inflamatorio: NOx y citoquinas.**

Para ello, se determinaron espectrofotométricamente en plasma los niveles de NOx (nitritos + nitratos), que es un índice fiable de la generación de  $NO^\bullet$ . La molécula de  $NO^\bullet$ , producida endógenamente, es muy inestable y reacciona rápidamente con el agua produciendo nitritos. A su vez, los nitritos se oxidan fácilmente a nitratos en solución acuosa y a pH 7.4, lo que ocurre normalmente en el organismo en proporción variable. Por lo tanto, la determinación de los nitritos nos proporciona una información indirecta sobre los niveles de  $NO^\bullet$  en el organismo.

La concentración de nitritos presentes en la muestra se determina mediante una técnica colorimétrica basada en la reacción de Griess (Griess, 1879). El reactivo de Griess está formado por naftil-etilen-diamina (NEDA) y sulfanilamida, se combina con los nitritos para formar un compuesto nitrogenado coloreado. La intensidad del color púrpura producido es proporcional a la cantidad del cromógeno formado y, en consecuencia, a la cantidad de nitritos existentes según la ley de Lambert-Beer. Para determinar los nitratos, éstos son tratados previamente con la enzima nitrato reductasa (NRd) (Granger y Taintor, 1995), que reduce los nitratos a nitritos a expensas del NADPH, y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (GP6DH), que recicla el NADPH a partir del  $NADP^+$  producido, evitando que la reacción de la NRd se detenga por falta de los cofactores. Los niveles plasmáticos de NOx se expresan en  $\text{nmol}/\text{ml}$  de plasma.

Asimismo, se determinaron los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$ , y TNF-  $\alpha$ ) por fluorescencia mediante un kit comercial (LINCOpex (Linco Research). El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit. Los niveles de citoquinas se expresan en  $\text{pg}/\text{ml}$  plasma.

## **6. Análisis estadístico.**

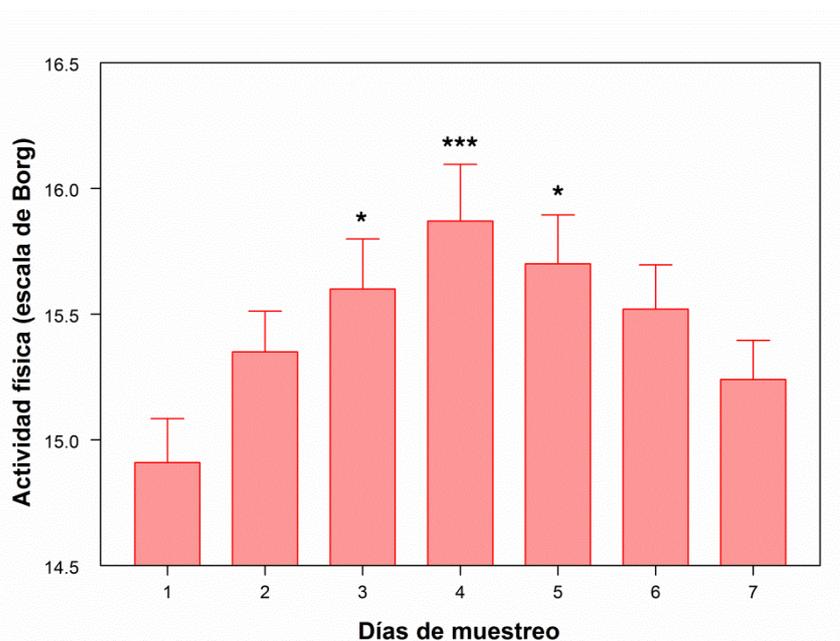
Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE. Se realizó un ANOVA seguido por el test de la t de Student para la comparación entre medias. El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS para Windows versión 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, USA). Se consideró estadísticamente significativa un valor de  $P < 0.05$ .

## ***IV. RESULTADOS***

## *Resultados*

## 1. Actividad física.

Los resultados de la estimación de la actividad física se muestran en la Figura 4, donde podemos apreciar que la actividad física promedio de los jugadores fue aumentando progresivamente a través de la temporada de competición hasta que llega un periodo que comienza a descender hasta el final de la temporada. El método utilizado para estimar la actividad física o carga interna desarrollada por el deportista fue la escala de percepción subjetiva del esfuerzo de Borg (RPE). La escala de 15 puntos, creada por Borg (1990), parte de 6 hasta 20, donde 6 equivale a “ningún esfuerzo ejercido”, 7 es “extremadamente ligero”, 9 es “muy ligero”, 11 es “ligero”, 13 es un “poco duro”, 15 es “duro”, 17 es “muy duro”, 19 es “extremadamente duro” y 20 es el “máximo esfuerzo”.



**Figura 4.** Cambios en la actividad física según la escala de Borg en los jugadores profesionales de balonmano estudiados a lo largo de un año de competición. \* $P < 0.05$  y \*\*\* $P < 0.001$  vs. día 1.

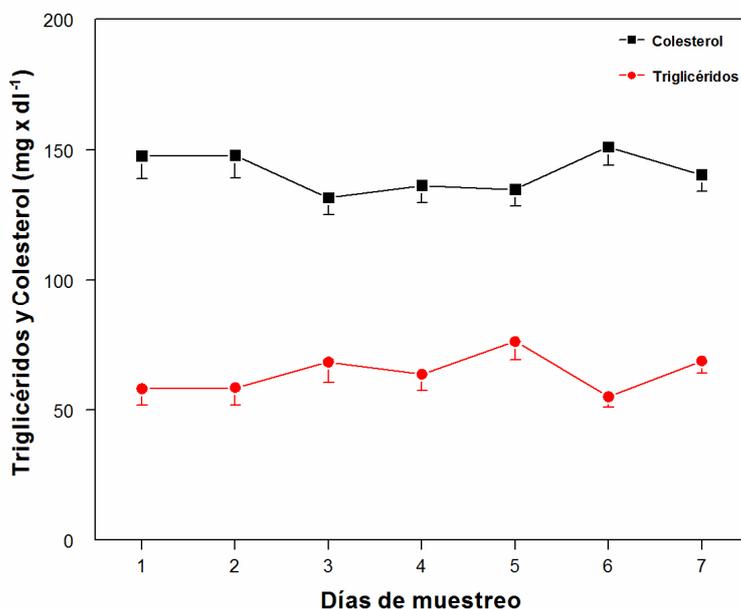
Antes del primer día de muestreo (20/8/2008 al iniciar el microciclo 1) los jugadores venían de un periodo de descanso por lo que muestran una actividad física promedio de 14,9 RPE. Para el segundo día de muestreo (8/10/2008 dentro del microciclo 8) los jugadores presentan una RPE promedio de 15,3. En el tercer día de muestreo (29/10/2008 dentro del microciclo 11) los jugadores muestran una RPE promedio de 15,6 siendo estadísticamente significativo. El cuarto día de muestreo

(3/12/2008 dentro del microciclo 16) presentan una RPE promedio de 15,8 siendo la más alta con significación estadística. El quinto día de muestreo (28/01/2009 dentro del microciclo 24) corresponde al primer muestreo del segundo macrociclo y presenta una RPE promedio de 15,7 siendo también estadísticamente significativa. El sexto día de muestreo (26/3/2009 dentro del microciclo 32) presenta una RPE promedio de 15,5. El séptimo y último día de muestreo (10/8/2009) presenta una RPE promedio de 15,2 después de finalizar la temporada de competición

## 2. Metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Los cambios metabólicos se evaluaron mediante la medida de las concentraciones de algunos parámetros sanguíneos como el perfil lipídico, que incluye la determinación de colesterol, LDL, HDL, VLDL y triglicéridos; los niveles de glucosa como indicador del metabolismo de los carbohidratos, y los niveles de hemoglobina.

Los valores de colesterol sérico tuvieron una tendencia a disminuir desde el tercer día de muestreo ( $131.56 \pm 6.5 \text{ mg} \times \text{dl}^{-1}$ ), lo que coincide con los días de mayor actividad física y el sexto día regresaron a los valores normales (Figura 5 y Tabla 3).

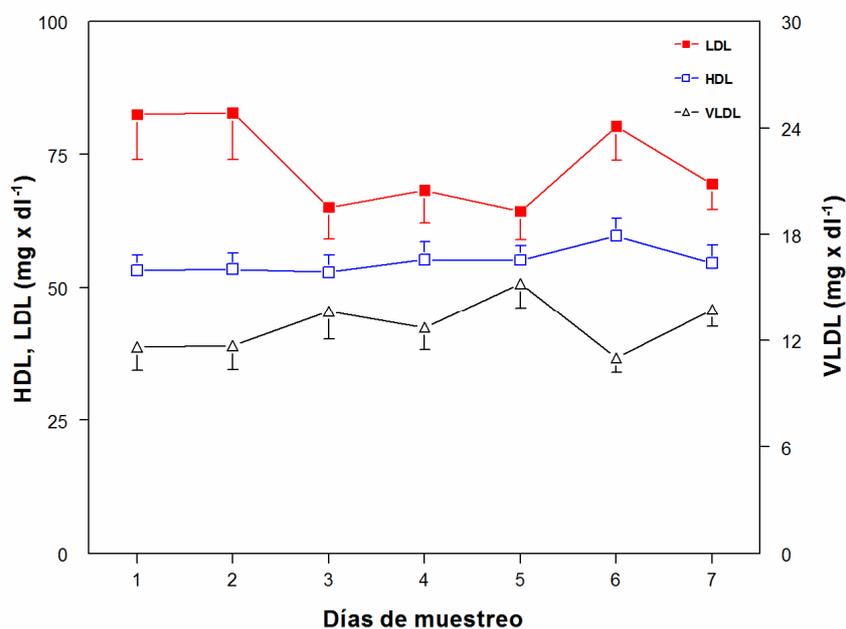


**Figura 5.** Cambios en las concentraciones séricas de colesterol, y triglicéridos en los deportistas estudiados.

Los niveles de triglicéridos (Figura 5 y Tabla 3) tienden a aumentar con la actividad física desde el tercer día de muestreo ( $68.25 \pm 7.86 \text{ mg x dl}^{-1}$ ) para, posteriormente, normalizarse.

Los valores de LDL (Figura 6 y Tabla 3) mostraron una tendencia a disminuir durante casi todo el período de actividad física máxima, aunque no significativamente. Los valores de HDL mostraron una tendencia a aumentar desde el cuarto día de muestreo ( $55.27 \pm 3.34 \text{ mg x dl}^{-1}$ ), aunque no de manera significativa.

Los niveles de VLDL no se modificaron significativamente a lo largo del estudio.



**Figura 6.** Cambios en las concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y baja densidad (LDL), y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en los jugadores estudiados.

Los índices de riesgo aterogénico (Colesterol/HDL y LDL/HDL) tuvieron una tendencia a disminuir con la actividad física (Figura 7 y Tabla 3). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en ningún momento a lo largo del estudio.

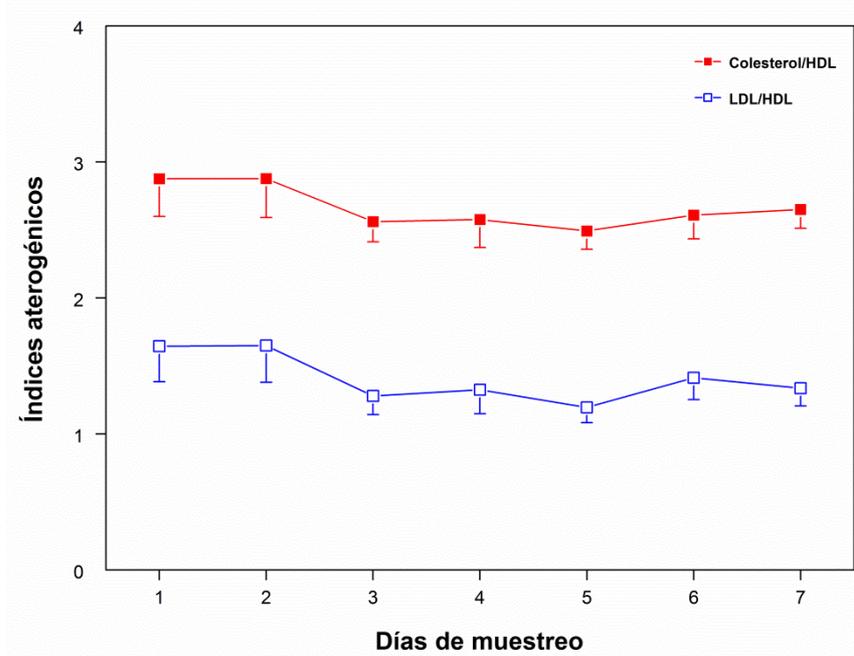
**Tabla 3. Parámetros de actividad física, metabolismo de lípidos y carbohidratos, hemoglobina y función renal de los jugadores de balonmano durante el año de competición.**

Parámetros	Día 1 (20/08/08)	Día 2 (08/10/08)	Día 3 (29/10/08)	Día 4 (03/12/08)	Día 5 (28/01/09)	Día 6 (26/03/09)	Día 7 (10/08/09)
Actividad Física (RPE)	14,91±0,17	15,35±0,16	15,60±0,19*	15,87±0,22***	15,70±0,19*	15,52±0,17	15,24±0,15
Colesterol (mg.dl <sup>-1</sup> )	147,53±8,6	147,84±8,8	131,56±6,5	136,26±6,4	134,73±6,2	151,06±7,1	140,40±6,3
Triglicéridos (mg.dl <sup>-1</sup> )	58,07±6,50	58,46±6,83	68,25±7,86	63,60±6,23	76,13±7,02	55,00±3,98	68,69±4,72
LDL (mg.dl <sup>-1</sup> )	82,53±8,54	82,84±8,80	65,08±5,93	68,29±6,08	64,33±5,28	80,33±6,41	69,46±4,81
HDL (mg.dl <sup>-1</sup> )	53,23±2,89	53,46±3,04	52,91±3,16	55,27±3,34	55,17±2,76	59,73±3,29	54,60±3,45
VLDL (mg.dl <sup>-1</sup> )	11,61±1,30	11,69±1,36	13,65±1,57	12,72±1,24	15,22±1,40	11,00±0,79	13,73±0,94
Colesterol/HDL	2,87±0,27	2,87±0,28	2,56±0,14	2,57±0,20	2,49±0,13	2,60±0,17	2,65±0,13
LDL/HDL	1,64±0,26	1,65±0,26	1,28±0,13	1,32±0,17	1,19±0,11	1,41±0,16	1,33±0,12
Glucosa (mg.dl <sup>-1</sup> )	79,58±1,55	80,16±1,37	84,93±1,23	88,4±1,92**	86,66±1,58*	91,2±1,38***	95,14±3,13***
Hemoglobina (g.dl <sup>-1</sup> )	15,26±0,22	15,53±0,22	15,67±0,32	15,76±0,26	16,78±0,40***	17,03±0,23***	16,28±0,14
Ácido úrico (mg.dl <sup>-1</sup> )	5,50±0,23	5,52±0,24	5,40±0,15	5,66±0,24	5,76±0,14	5,6±0,13	5,37±0,19
Urea (mg.dl <sup>-1</sup> )	36,43±2,37	36,74±2,48	39,98±1,42	37,66±1,74	38,13±1,50	35,20±1,67	34,63±1,60
Creatinina (mg.dl <sup>-1</sup> )	0,97±0,01	1,00±0,02	1,02±0,03	1,09±0,03*	1,08±0,03*	1,00±0,02	1,02±0,03

Datos representados como media ± EE,  $n = 16$ . RPE, “Rating of perceived exertion”; LDL, Low Density Lipoprotein; HDL, High Density Lipoprotein; VLDL, Very Low Density Lipoprotein.

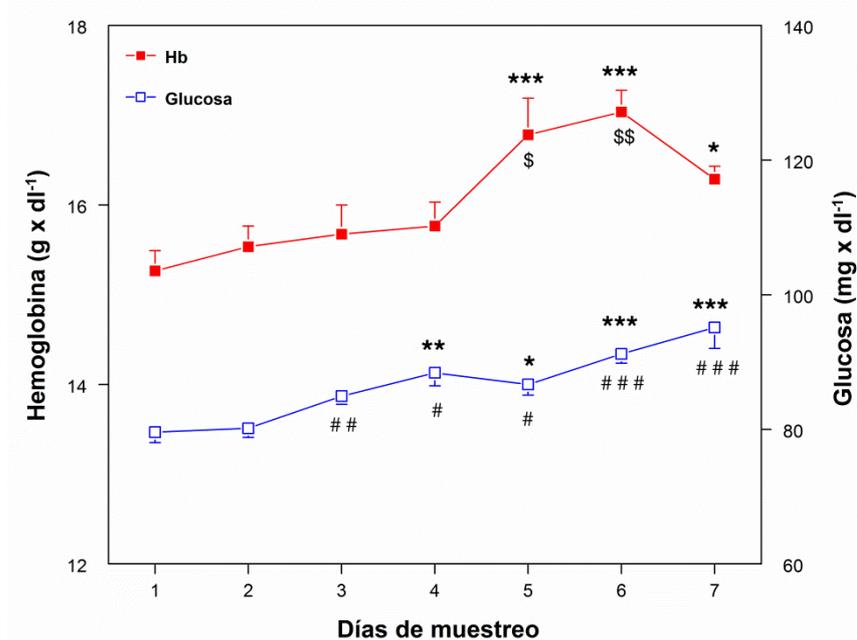
\*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ , and \*\*\*  $P < 0,001$  vs dia 1.

Resultados



**Figura 7.** Cambios en los índices de riesgo aterogénico (Colesterol/HDL y LDL/HDL) en los deportistas estudiados.

Con respecto a la hemoglobina (Figura 8 y Tabla 3), sus niveles aumentaron en sangre a lo largo del ejercicio, aunque al final del estudio se recuperaron los niveles basales.

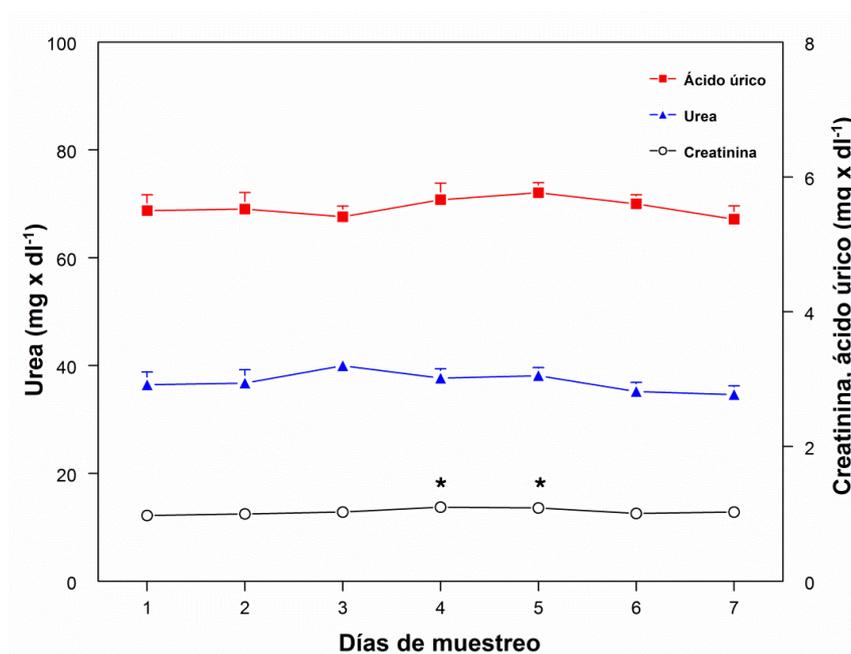


**Figura 8.** Cambios en la concentración de hemoglobina y glucosa en los deportistas durante el año de competición. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  vs. día 1;  $^{\$}$  $P < 0.05$  vs. días 2, 3 y 4;  $^{\$\$}$  $P < 0.01$  vs. días 2, 3, 4 y 7;  $^{\#}$  $P < 0.05$  vs. días 2 y 7;  $^{\#\#}$  $P < 0.01$  vs. día 7;  $^{\#\#\#}$  $P < 0.001$  vs. día 2.

Por otro lado, los valores de glucosa (Figura 8 y Tabla 3) mostraron una tendencia significativa a aumentar a lo largo del año de competición, alcanzando al final del estudio unos valores máximos, aunque siempre dentro del rango de normalidad.

### 3. Función renal y electrolitos.

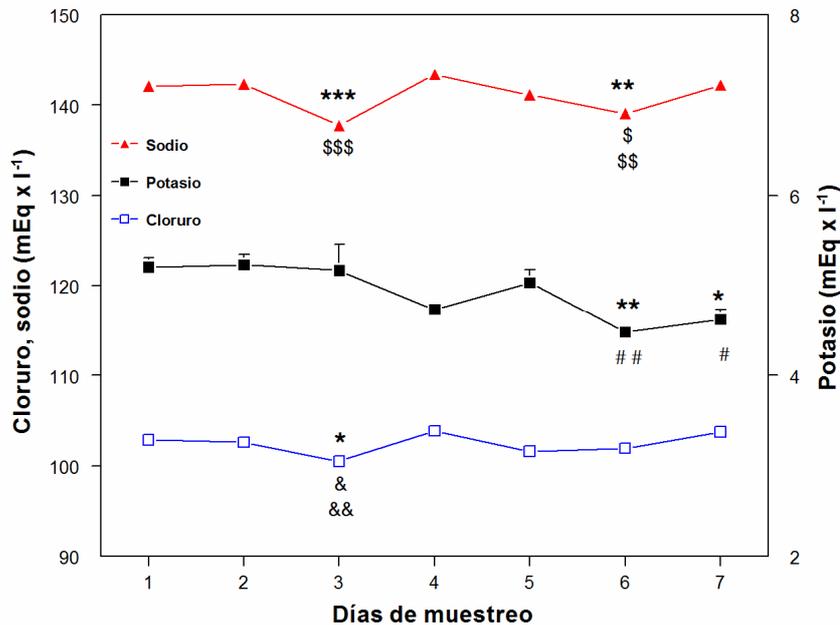
La función renal se evaluó mediante la medida de las concentraciones séricas de creatinina como indicador de tasa de filtración glomerular y fallo renal; y la medida de urea y ácido úrico como indicadores de función excretora del riñón y aumento de catabolismo (Figura 9 y Tabla 3). Los niveles de urea no variaron significativamente a lo largo del estudio, al igual que ocurrió con el ácido úrico. Los niveles de creatinina aumentaron ligeramente entre el cuarto ( $1.09 \pm 0.03 \text{ mg x dl}^{-1}$ ) y quinto día de muestreo ( $1.08 \pm 0.03 \text{ mg x dl}^{-1}$ ). Los valores más altos de ácido úrico, urea y creatinina coinciden con los días de mayor actividad física.



**Figura 9.** Cambios en las concentraciones séricas de ácido úrico, urea y creatinina en los deportistas durante el año de competición. \*P<0.05 vs. día 1.

Los valores de electrolitos se muestran en la Figura 10 y la Tabla 4. En relación al sodio, sus niveles más bajos se observaron el tercer ( $137.7 \pm 0.57 \text{ mEq x l}^{-1}$ ) y sexto día de muestreo ( $139.0 \pm 0.33 \text{ mEq x l}^{-1}$ ). Destaca la tendencia a la disminución del potasio desde el tercer día de muestreo ( $5.16 \pm 0.28 \text{ mEq x l}^{-1}$ ), presentando los niveles más bajos el sexto

día ( $4.8 \pm 0.06 \text{ mEq x l}^{-1}$ ). Los niveles de cloruro también bajaron al tercer día de muestreo ( $100.5 \pm 0.47 \text{ mEq x l}^{-1}$ ), aunque se recuperaron después.

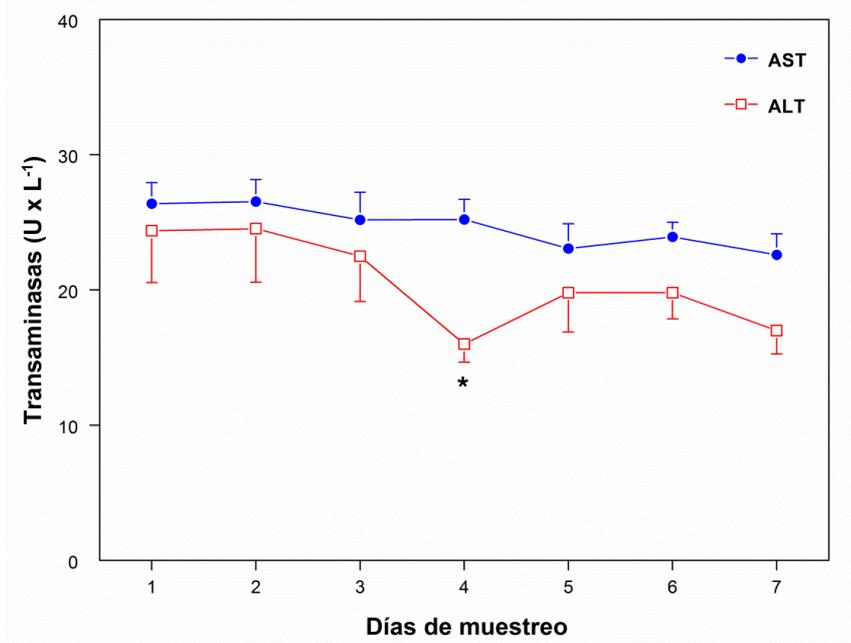


**Figura 10.** Cambios en las concentraciones séricas de sodio, potasio y cloruro en los jugadores. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , y \*\*\* $P < 0.001$  vs. día 1; <sup>§</sup> $P < 0.05$  vs. días 4 y 5; <sup>§§</sup> $P < 0.01$  vs. días 2, 4 y 7; <sup>§§§</sup> $P < 0.001$  vs. días 2, 4, 5 y 7; # $P < 0.05$  y ## $P < 0.01$  vs. días 2 y 3; & $P < 0.05$  vs. día 2; && $P < 0.01$  vs. días 4 y 7.

#### 4. Función hepática.

Se evaluó la función hepática mediante la medición de la actividad sérica de la aspartato aminotransferasa (AST) como marcador no específico de lesiones del parénquima hepático y la alanina aminotransferasa (ALT) como marcador específico (Figura 11 y Tabla 4).

Los valores más bajos de transaminasas se observaron en los días de actividad física elevada. Los niveles de AST tienden a disminuir desde el tercer día de muestreo ( $25.18 \pm 2.04 \text{ U x l}^{-1}$ ), alcanzando los valores más bajos al quinto día ( $23.06 \pm 1.82 \text{ U x l}^{-1}$ ). Por su parte, los valores más bajos de ALT se observaron el cuarto ( $16 \pm 1.33 \text{ U x l}^{-1}$ ) y el último día de muestreo ( $17.00 \pm 1.73 \text{ U x l}^{-1}$ ).



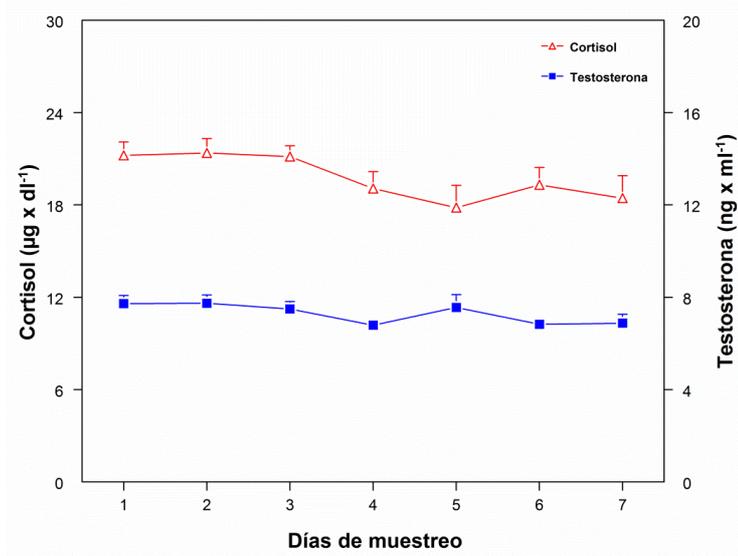
**Figura 11.** Cambios en las actividades séricas de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en los jugadores durante el año de competición. \* $P < 0.05$  vs. día 1.

## 5. Hormonas de estrés y marcadores de daño muscular.

Como marcadores de estrés se determinaron cortisol y testosterona.

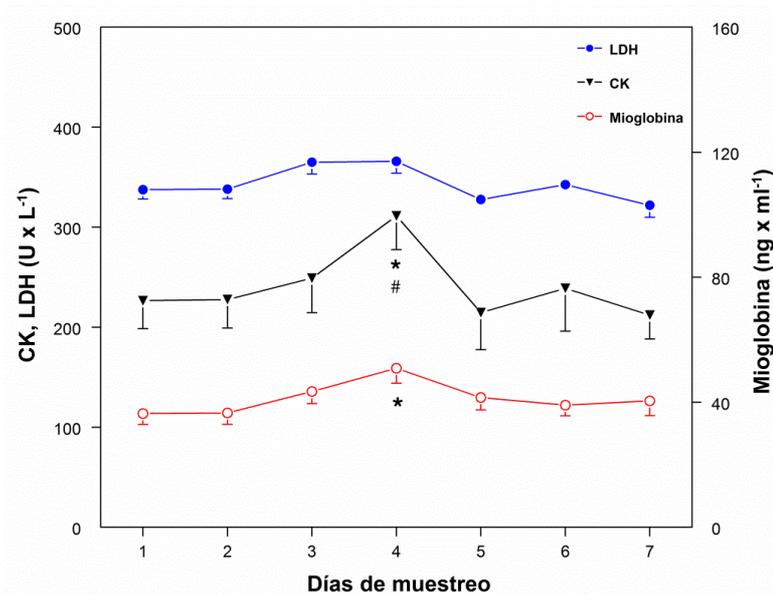
Los niveles de cortisol (Figura 12 y Tabla 4) tienden a disminuir desde el tercer día de muestreo ( $21.14 \pm 0.69 \mu\text{g} \times \text{dl}^{-1}$ ), y el quinto día mostraron el valor más bajo ( $17.82 \pm 1.44 \mu\text{g} \times \text{dl}^{-1}$ ), recuperándose ligeramente a continuación. La testosterona tendió a disminuir el cuarto ( $6.78 \pm 0.26 \text{ng} \times \text{ml}^{-1}$ ) y sexto día de muestreo ( $6.83 \pm 0.23 \text{ng} \times \text{ml}^{-1}$ ).

## Resultados



**Figura 12.** Cambios en las concentraciones séricas de cortisol y testosterona en los jugadores de balonmano durante la competición.

Como marcadores de daño muscular, se determinaron las actividades de CK, LDH, y mioglobina séricas. Los valores más altos de marcadores de daño muscular (Figura 13 y Tabla 4) se encontraron en los días de mayor actividad física.



**Figura 13.** Cambios en las actividades séricas de LDH, CK y de mioglobina en los deportistas a lo largo del año de competición. \* $P < 0.05$  vs. día 1; # $P < 0.05$  vs. día 7.

**Tabla 4. Actividad Física, electrolitos principales, perfil hepático, hormonas de estrés y marcadores de daño muscular de los jugadores de balonmano durante el año de competición.**

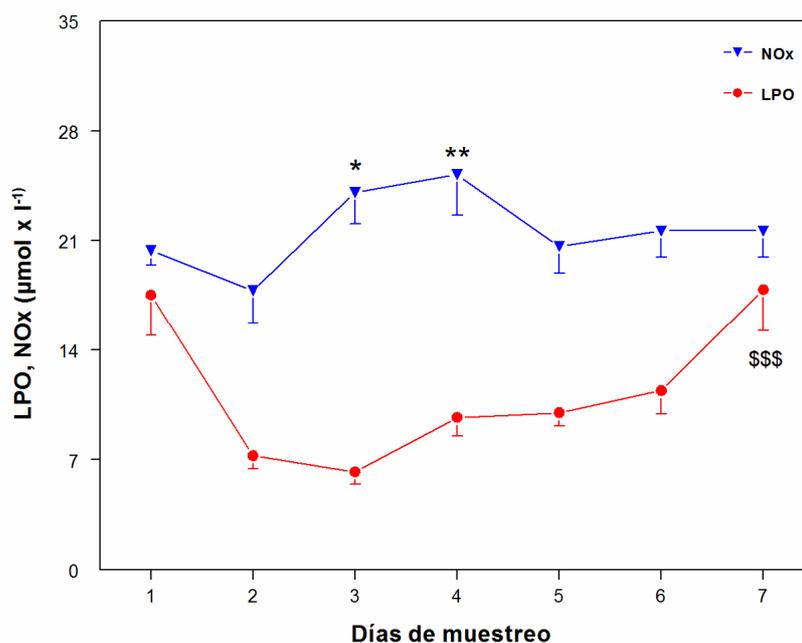
Parámetros	Día 1 (20/08/08)	Día 2 (08/10/08)	Día 3 (29/10/08)	Día 4 (03/12/08)	Día 5 (28/01/09)	Día 6 (26/03/09)	Día 7 (10/08/09)
Actividad Física (RPE)	14,91±0,17	15,35±0,16	15,60±0,19*	15,87±0,22***	15,70±0,19*	15,52±0,17	15,24±0,15
Sodio (mEq x l <sup>-1</sup> )	142,0±0,59	142,3±0,64	137,7±0,57***	143,0±0,47	141,1±0,57	139,0±0,33**	142,2±0,73
Potasio (mEq x l <sup>-1</sup> )	5,20±0,10	5,23±0,11	5,16±0,28	4,73±0,08	5,03±0,14	4,48±0,06**	4,62±0,11*
Cloruro (mEq x l <sup>-1</sup> )	102,8±0,63	102,6±0,75	100,5±0,47*	103,8±0,45	101,6±0,52	101,9±0,37	103,7±0,54
AST (U x l <sup>-1</sup> )	26,38±1,54	26,53±1,61	25,18±2,04	25,21±1,48	23,06±1,82	23,92±1,07	22,60±1,55
ALT (U x l <sup>-1</sup> )	24,38±3,83	24,53±3,96	22,50±3,34	16,00±1,33*	19,80±2,91	19,80±1,94	17,00±1,73
Cortisol (μg x dl <sup>-1</sup> )	21,220,86	21,37±0,93	21,14±0,69	19,06±1,08	17,82±1,44	19,31±1,11	18,43±1,46
Testosterona (ng x ml <sup>-1</sup> )	7,72±0,35	7,74±0,35	7,49±0,31	6,78±0,26	7,56±0,55	6,83±0,23	6,87±0,38
LDH (U x l <sup>-1</sup> )	337,5±9,4	338,0±9,5	365,0±11,8	365,9±11,9	327,7±6,5	342,60±7,0	322,00±12,0
CK (U x l <sup>-1</sup> )	226,6±28,1	227,7±28,5	249,1±34,5	311,4±33,7*	214,6±37,1	239,0±42,9	212,2±23,9
Mioglobina (ng x ml <sup>-1</sup> )	36,35±3,46	36,58±3,64	43,44±3,89	50,88±4,83*	41,51±3,98	39,06±3,42	40,44±4,75

Datos expresados como media ± EE; n = 16. RPE, "Rating of perceived exertion"; AST, Aspartato Aminotransferasa; ALT, Alanina Aminotransferasa; LDH, Lactato Deshidrogenasa; CK, Creatina quinasa, \* P<0.05, \*\* P<0.01, and \*\*\* P<0.001 vs día 1

Los niveles de LDH, aunque no variaron significativamente, tienden a aumentar desde el tercer día de muestreo ( $365 \pm 11.8 \text{ U x l}^{-1}$ ), observándose los valores más bajos el quinto día ( $327.7 \pm 6.5 \text{ U x l}^{-1}$ ). La CK si se modificó de manera importante, alcanzando un máximo al cuarto día de muestreo ( $311.4 \pm 33.7 \text{ U x l}^{-1}$ ), para bajar a continuación a sus valores más bajos el quinto día ( $214.6 \pm 37.1 \text{ U x l}^{-1}$ ). Con respecto a la mioglobina, sus niveles aumentaron también de manera significativa el cuarto día de muestreo ( $50.88 \pm 4.83 \text{ ng x ml}^{-1}$ ), mientras que el resto del período de estudio no cambiaron significativamente.

## 6. Estado redox.

Los valores de NOx y LPO se muestran en la Figura 14 y Tabla 5. Los niveles de NOx aumentaron significativamente el tercer y cuarto día de muestreo y luego tuvieron una tendencia a disminuir, manteniéndose más o menos estables hasta el final del estudio.

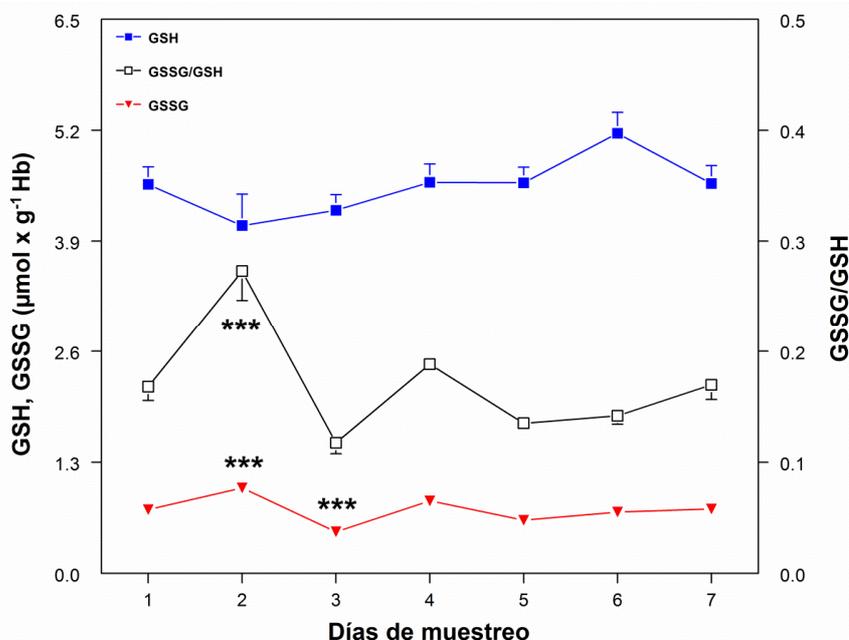


**Figura 14.** Cambios en los niveles plasmáticos de nitritos (NOx) y peróxidos lipídicos (LPO) en los jugadores de balonmano durante el año de competición. \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$  vs. días 1, 7; \$\$\$ $P < 0.001$  vs. días 2, 3, 4, 5 y 6.

Los niveles de nitritos al final del año de competición ( $20,95 \pm 0,98 \text{ µmol x l}^{-1}$ ) fueron similares a los niveles basales. Los valores más altos de nitritos coincidieron con los días de mayor actividad física. Los niveles de LPO mostraron una tendencia a disminuir

desde el segundo día y luego tuvieron una tendencia a aumentar desde el tercer día de muestreo y al final del año de competición regresaron a sus valores basales.

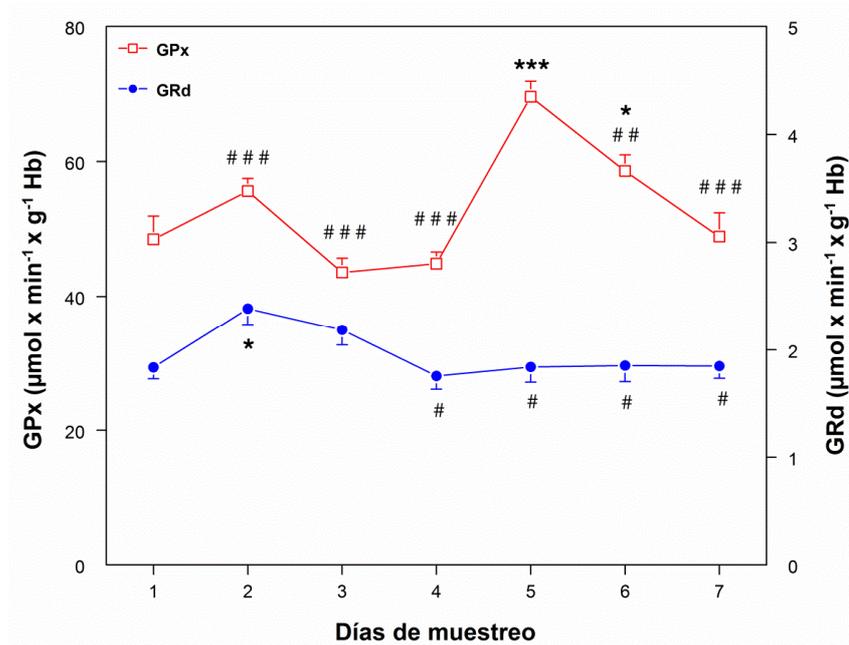
El contenido de GSH en los eritrocitos mostró una tendencia a aumentar con la actividad física (Figura 15 y Tabla 5). El GSH presentó unos valores basales de alrededor de  $4.56 \pm 0.20 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1} \text{Hb}$  y, aunque tuvo una ligera tendencia a aumentar a lo largo del estudio, sobre todo al sexto día ( $5.16 \pm 0.24 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1} \text{Hb}$ ), estos cambios no fueron significativos. Los valores de GSSG aumentan significativamente al segundo día de muestreo ( $1.0 \pm 0.05 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1} \text{Hb}$ ), siendo los más altos de la temporada de competición, y disminuyen en el siguiente muestreo, que a su vez corresponden a los valores más bajos del estudio ( $0,48 \pm 0,03 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1} \text{Hb}$ ). El índice GSSG/GSH aumentó notablemente en el segundo muestreo, debido a que ese día coincidieron el valor más alto de GSSG y el valor más bajo de GSH.



**Figura 15.** Cambios de los niveles eritrocitarios de GSH, GSSG e índice GSSG/GSH en los jugadores de balonmano. \*\*\* $P < 0.001$  vs días 1 y 7.

La actividad enzimática de la GPx eritrocitaria (Figura 16 y Tabla 5) aumenta significativamente el quinto día de muestreo ( $69.60 \pm 2.28 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1} \text{Hb}$ ); se mantiene elevada al sexto día, para disminuir a valores basales al final del estudio. En el resto de los días del estudio, la actividad de la GPx estaba significativamente más baja. Con respecto a la actividad de la GRd, su actividad enzimática eritrocitaria aumentó significativamente el segundo día de muestreo ( $2.38 \pm 0.14 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1} \text{Hb}$ ), disminuyendo posteriormente a valores controles. Desde la mitad del estudio en

adelante (días 4-7), la actividad de la GRd se mantuvo significativamente por debajo de la determinada al día 2.



**Figura 16.** Cambios en las actividades eritrocitarios de GPx y GRd en los deportistas a lo largo del año de competición. \* $P < 0.05$  y \*\*\* $P < 0.001$  vs. día 1; # $P < 0.05$  vs. día 2; ## $P < 0.01$  vs. día 5; ### $P < 0.001$  vs. día 5.

**Tabla 5. Actividad Física y parámetros oxidativos e inflamatorios de los jugadores de balonmano durante el año de competición.**

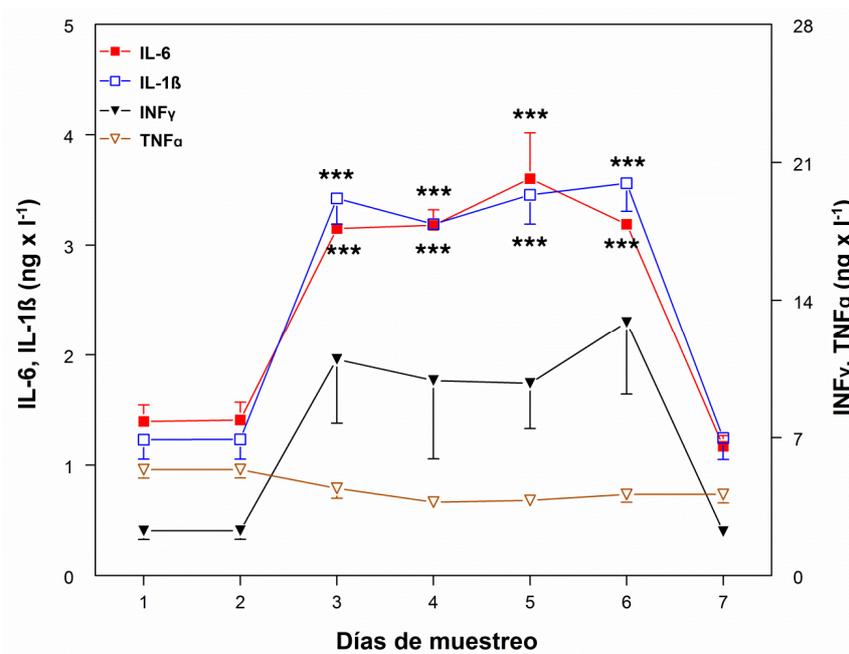
Parámetros	Día 1 (20/08/08)	Día 2 (08/10/08)	Día 3 (29/10/08)	Día 4 (03/12/08)	Día 5 (28/01/09)	Día 6 (26/03/09)	Día 7 (10/08/09)
Actividad Física (RPE)	14,91±0,17	15,35±0,16	15,60±0,19*	15,87±0,22***	15,70±0,19*	15,52±0,17	15,24±0,15
NOx (μmol x l <sup>-1</sup> )	20,37±0,95	17,82±2,08	24,08±1,98*	25,23±2,61**	20,64±1,73	21,63±1,67	20,95±0,98
LPO (μmol x l <sup>-1</sup> )	17,53±2,61	7,26±0,83	6,23±0,78	9,7±1,1	9,9±0,85	11,4±1,5	17,8±2,6\$\$\$
GSH (μmol x g <sup>-1</sup> Hb)	4,56±0,20	4,08±0,36	4,26±0,18	4,58±0,21	4,58±0,18	5,16±0,24	4,57±0,21
GSSG (μmol x g <sup>-1</sup> Hb)	0,75±0,04	1,0±0,05***	0,48±0,03***	0,84±0,02	0,62±0,04	0,71±0,03	0,75±0,04
GSSG/GSH	0,16±0,013	0,27±0,026***	0,11±0,009	0,18±0,007	0,13±0,006	0,14±0,007	0,16±0,013
GPx (nmol, min <sup>-1</sup> x g <sup>-1</sup> Hb)	48,46±3,43	55,61±1,87	43,56±2,10	44,86±1,72	69,60±2,28***	58,58±2,38*	48,86±3,51
GRd (nmol, min <sup>-1</sup> x g <sup>-1</sup> Hb)	1,83±0,10	2,38±0,14*	2,18±0,14	1,75±0,12	1,84±0,14	1,85±0,15	1,84±0,11
IL-1β (ng x l <sup>-1</sup> )	1,23±0,17	1,23±0,17	3,42±0,23***	3,19±0,01***	3,45±0,26***	3,56±0,25***	1,24±0,19
IL-6 (ng x l <sup>-1</sup> )	1,39±0,15	1,40±0,16	3,15±0,03***	3,18±0,14***	3,60±0,41***	3,19±0,01***	1,17±0,09
INFγ (ng x l <sup>-1</sup> )	2,26±0,43	2,27±0,43	10,97±3,24	9,89±3,97	9,74±2,29	12,88±3,67	2,22±0,28
TNFα (ng x l <sup>-1</sup> )	5,37±0,42	5,37±0,43	4,42±0,50	3,72±0,31	3,81±0,30	4,11±0,40	4,11±0,42

Datos expresados como media ± EE; n = 16. RPE, "Rating of perceived exertion"; LPO, lipoperóxidos; NOx, nitritos; GSH, glutation reducido; GSSG, glutation oxidado; GPX, glutation peroxidasa; GRd, glutation reductasa; IL-1, interleuquina-1β; IL-6, interleuquina-6; INF γ, interferón γ; TNF α, factor de necrosis tumoral-α. \* P<0.05. \*\* P<0.01, y \*\*\* P<0.001 vs día 1; \$\$\$P<0.001 vs. días 2, 3, 4, 5 y 6.

## 7. Estado inflamatorio.

En general, las citoquinas pro-inflamatorias aumentaron significativamente con la actividad física, y se mantuvieron altas durante toda la temporada, para descender al final del estudio a valores basales (Figura 17 y Tabla 5). Fundamentalmente, la IL-1 $\beta$  y la IL-6 aumentaron muy significativamente con el inicio del ejercicio hasta el final de la temporada, regresando a valores controles. El INF $\gamma$  también aumentó con el ejercicio, aunque no de manera significativa, principalmente debido a la gran dispersión de sus valores. pero estos cambios no llegaron a ser significativos.

Los valores más altos en estas tres citoquinas coincidieron con los días de mayor actividad física. El comportamiento opuesto lo tuvo el TNF $\alpha$ , que disminuyó, aunque no significativamente, con la actividad física, normalizándose al final del estudio.



**Figura17.** Cambios en los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  en los jugadores profesionales de balonmano durante un año de competición. \*\*\*P<0.001 vs. días 1, 2 y 7.



## ***V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS***



## **1. Actividad Física y programa de entrenamiento.**

Los resultados de la estimación del ejercicio muestran que la actividad física promedio de los jugadores fue aumentando progresivamente desde el inicio del programa de entrenamiento, alcanzando un máximo en el microciclo 16, hacia la mitad de la temporada, durante el mes de diciembre de 2008, después de un período de entrenamiento de alta intensidad y después de jugar un gran número de partidos intensos con rivales difíciles. Después del microciclo 16, el entrenamiento pasa a un período destinado al mantenimiento físico de los jugadores que coincide con la finalización del primer macrociclo y el inicio del segundo, con partidos importantes en donde el equipo logra colocarse en una buena posición dentro de la liga y el entrenamiento enfatiza en el aprendizaje de tácticas para enfrentar a los rivales con que tiene que competir para luchar por el campeonato. Después del microciclo 24 el entrenamiento pasa a un periodo de moderada a alta intensidad con un gran número de partidos, sin descuidar el estudio táctico para enfrentar con éxito el final de la liga. En esta etapa se nota una disminución de la actividad física del entrenamiento para poder jugar los partidos finales que llevan al equipo a ganar el campeonato de balonmano, lo que ocurre al finalizar la temporada en marzo de 2009.

Podemos apreciar que el promedio de la actividad física durante toda la temporada está en el intervalo de 14-16, es decir que corresponde a un esfuerzo de “poco duro” a “duro” según la escala utilizada. Durante el período de octubre de 2008 a enero de 2009 encontramos el mayor esfuerzo físico de los jugadores que corresponde con la fase más dura del año de competición.

Antes del primer día de muestreo (20/8/2008), los jugadores venían de un periodo de descanso por lo que muestran una actividad física promedio de 14,9 RPE. Para el segundo día de muestreo (8/10/2008 dentro del microciclo 8) los jugadores presentan una RPE de 15,3 ya que han iniciado la temporada de competición y han llevado un entrenamiento de 135 horas más moderado que intenso. En el tercer día de muestreo (29/10/2008 dentro del microciclo 11) los jugadores muestran una RPE de 15,6 ya que han tenido que jugar partidos más intensos y han llevado un entrenamiento de 63 horas de moderada a alta intensidad. El cuarto día de muestreo (3/12/2008 dentro del microciclo 16) presentan una RPE de 15,8 siendo la más alta con significación estadística ya que han tenido un mayor número de partidos realizados y llevan un entrenamiento de 77 horas más intenso con aumento de cargas de trabajo. El quinto día

de muestreo (28/01/2009 dentro del microciclo 24) presentan una RPE de 15,7 siendo este el primer muestreo del segundo macrociclo. Aquí han realizado partidos tanto moderados como intensos y el entrenamiento de 203 horas ha sido de moderada a alta intensidad. El sexto día de muestreo (26/3/2009 dentro del microciclo 32) presentan una RPE de 15,5 después de jugar varios partidos de baja, moderada y alta intensidad y el entrenamiento de 269 horas ha sido de moderado a intenso pero con menos carga de trabajo. El séptimo día de muestreo (10/8/2009) presentan una RPE de 15,2 después de finalizar la temporada de competición y regresar de un periodo de descanso.

## **2. Metabolismo de Lípidos y Carbohidratos.**

Los resultados sugieren que el ejercicio realizado por los jugadores entrenados bajo condiciones controladas, induce cambios metabólicos, endocrinos y musculares que culminan en un estado de estrés metabólico.

Nuestros resultados muestran que jugadores profesionales de balonmano sometidos a sesiones de entrenamiento y ejercicio de larga duración durante un año de competición, responden mejorando su perfil lipídico. Los niveles séricos de colesterol y LDL tienden a disminuir durante los días de mayor actividad física y luego normalizan sus valores. Esta bajada de los niveles de colesterol coincide con la tendencia a aumentar de las HDL durante los días de mayor actividad física ya que las HDL son las responsables del transporte inverso del colesterol hacia el hígado sacándolo de la circulación. Los niveles séricos de colesterol tuvieron el mismo comportamiento que previamente se había mostrado en jugadores de baloncesto (Martinez y cols., 2010), piragüistas de élite (Teixeira et al., 2009) y en futbolistas profesionales (Zanella y cols., 2011). Los altos niveles de HDL en el plasma podrían ofrecer una protección adicional por inhibición de la oxidación de las LDL evitando el consumo de antioxidantes liposolubles endógenos (Brites y cols., 1999). Mediante la reducción de las LDL, disminuye la probabilidad de su oxidación y de producir peroxidación lipídica y los subsiguientes problemas de la aterosclerosis (Wang y cols., 2006). Los índices de riesgo aterogénico (colesterol/HDL y LDL/HDL) confirman lo antes mencionado ya que tuvieron una tendencia a disminuir con la actividad física, lo que demuestra la reducción del riesgo cardiovascular como un beneficio del ejercicio físico (Goldberg y Elliot, 1987)

Asimismo, los niveles de triglicéridos y VLDL tuvieron una tendencia a aumentar con la actividad física como se observó en jugadores de baloncesto (Martinez *et al.*, 2010), ciclistas (Aguilo y colbs., 2003) y piragüistas de élite (Teixeira y colbs., 2009).

Nuestros resultados mostraron una elevación de la hemoglobina de los jugadores a lo largo del entrenamiento indicando una adaptación del organismo debido al incremento en la demanda de oxígeno derivada del ejercicio, lo que demuestra que llevaron un programa de entrenamiento bien equilibrado como se observó en atletas de remo (Yan y colbs., 2009). Los niveles de glucosa mostraron una tendencia a aumentar a lo largo del entrenamiento, lo que podría deberse a un aumento en las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que estimulan la glucogenolisis muscular. El aumento de la glucosa también puede deberse a una estimulación de la gluconeogénesis hepática por las mismas hormonas adrenales (López Chicharro and Fernández Vaquero, 2006). Por último, el aumento de glucosa también puede reflejar un estado de resistencia a la insulina en adición a una gluconeogénesis proteolítica como adaptación al ejercicio crónico (Branth y colbs., 2009).

### **3. Función Renal y electrolitos.**

El aumento en los valores de creatinina durante los días de mayor actividad física es un indicador de un aumento en la actividad muscular ya que proviene de la creatina que se libera de la ruptura de enlaces de alta energía del fosfato de creatina. Estos resultados son comparables a aquellos obtenidos en jugadores de baloncesto (Martinez y colbs., 2010) y corredores adolescentes entrenados (Tian y colbs., 2011). Los valores más bajos de electrolitos (sodio y cloruro) se observaron en los días de mayor actividad física debido a un aumento de la sudoración como se observó en nueve corredores de ultramaratón experimentados que participaron en la ultra maratón de 1600 kilómetros en Nanango, Australia (Fallon y colbs., 1999). La disminución en potasio en sangre puede deberse a la liberación continua de aldosterona a lo largo de la temporada, como mecanismo preventivo de pérdida de sodio y agua, ya que los riñones intercambian  $K^+$  o  $H^+$  por cada  $Na^+$  reabsorbido (López Chicharro and Fernández Vaquero, 2006). En este mecanismo probablemente también participa la ADH.

#### **4. Función hepática, hormonas de estrés y marcadores de daño muscular.**

Los valores más bajos de transaminasas (AST y ALT) se observaron en los días de mayor actividad física. Durante estos días los niveles de glucosa aumentaron quizá debido a gluconeogénesis, así que la disminución de las transaminasas la podemos explicar diciendo que en ese momento no era necesario una alta tasa de transaminación para producir sustratos para gluconeogénesis. Las concentraciones séricas de las hormonas de estrés (cortisol y testosterona) también tienden a disminuir con el aumento de la actividad física, lo que puede ser un mecanismo de adaptación al estrés para movilizar sustratos adaptando su tasa metabólica basal a un nivel más alto (Martinez y colbs., 2010). Los valores más altos en los marcadores de daño muscular (LDH, CK y mioglobina) se presentaron en los días de mayor actividad física, producto del daño a las fibras del musculo esquelético como también se demostró tanto en ejercicio físico intenso en corredores de ultramaratón (Fallon y colbs., 1999), como en ciclistas profesionales de carretera (Serrano y colbs., 2010), e incluso en varones sanos (Suzuki y colbs., 1999).

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas sugieren que los jugadores profesionales de balonmano sometidos a sesiones de entrenamiento y ejercicio de larga duración durante un año de competición, responden aumentando su estrés metabólico. Dicha exposición repetida del sistema a un estrés metabólico aumentado, conduce al organismo a un balance homeostático durante las siguientes sesiones de entrenamiento.

#### **5. Estado redox.**

Los resultados obtenidos en los parámetros oxidativos sugieren que los jugadores profesionales de balonmano bien entrenados sometidos a sesiones de entrenamiento y ejercicio de larga duración durante un año de competición, responden aumentando sus niveles de estrés oxidativo e inflamación. Los resultados mostraron un significativo aumento de los nitritos reflejando una reacción inflamatoria por el daño de la fibra muscular. Los nitritos son una estimación indirecta de la producción de especies reactivas de nitrógeno, pero también puede mostrar una alta producción de  $\text{NO}^\bullet$ . Este aumento es NOS-dependiente se correlaciona con la función endotelial, pero no podemos descartar que ese  $\text{NO}^\bullet$  derive también de la actividad de la iNOS debido a que durante el ejercicio es evidente el proceso inflamatorio que se produce. El ejercicio aumenta la concentración plasmática de nitritos en los sujetos sanos. La concentración

de nitritos post-ejercicio y la edad son predictores independientes de la duración y la fuerza del estrés (Rassaf y cols., 2007).

El ejercicio físico aumenta el flujo sanguíneo y la fuerza de cizallamiento o “shear stress”, lo que resulta en un aumento de la producción de NO<sup>•</sup> y la regulación positiva de la actividad de eNOS constitutiva. La fuerza de cizallamiento es un potente estímulo fisiológico para la liberación de NO<sup>•</sup>, lo que interfiere no sólo en la vasodilatación, sino también en otros mecanismos moleculares, como la producción de superóxido. Los episodios repetidos de aumento del flujo sanguíneo con el ejercicio pueden provocar una mejoría de la función endotelial y la obtención de beneficios a largo plazo producto del ejercicio regular. El mecanismo es probable que implique un aumento crónico en la producción de NO<sup>•</sup> mediada por un aumento en la expresión de eNOS (Di y cols., 2009).

Los peróxidos lipídicos (LPO), que representan el daño oxidativo a los lípidos de membrana, aumentaron después del ejercicio, lo que probablemente refleja un estado hiperoxidativo del plasma. Sin embargo, durante el ejercicio la LPO se mantuvo en niveles más bajos, sugiriendo una activación de los sistemas de defensa antioxidante endógenos. En un estudio hecho en jugadores de fútbol americano, se observó un aumento de la peroxidación lipídica después de un partido de fútbol americano profesional, midiendo el aumento de peróxidos totales y anticuerpos contra LDL oxidadas (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009). En jugadores de rugby no entrenados se encontró asimismo un aumento exacerbado en la peroxidación lipídica comparada con jugadores entrenados. Por otra parte, los atletas entrenados han demostrado que poseen mayores niveles de protección antioxidante, así como menores niveles de peroxidación lipídica en reposo en comparación con los controles sedentarios (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009).

Los cambios de los niveles de glutatión reflejan cambios en el estrés oxidativo inducido por ejercicio. Por lo general, después del ejercicio hay una disminución en el glutatión reducido (GSH), y un aumento de glutatión oxidado (GSSG). Sin embargo, los jugadores de balonmano de nuestro estudio fueron capaces de mantener una adecuada defensa antioxidante, ya que aumentaron su glutatión intracelular. Los niveles de glutatión normalmente vuelven a los niveles basales dentro de 15-30 minutos de recuperación post-ejercicio. Los cambios en los niveles de glutatión pueden estar afectados por el momento del muestreo (si se hace inmediatamente después del ejercicio o tiempo después del mismo); por la velocidad de reducción del GSSG a GSH, que se

realiza rápidamente in vivo a través de la glutathion reductasa, y por la condición de entrenamiento de los sujetos (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009). Entre las enzimas antioxidantes en el músculo esquelético, la actividad de glutathion peroxidasa y también la de superóxido dismutasa siempre han demostrado que aumentan de una manera dependiente de la intensidad del entrenamiento físico (Clarkson y Thompson, 2000).

La actividad de la glutathion peroxidasa fue mayor después del ejercicio que en reposo, aumentando así su capacidad de eliminar los peróxidos generados, lo que reduce la necesidad de la actividad del ciclo del glutathion para esas funciones. A su vez, la actividad de glutathion reductasa tuvo tendencia a disminuir durante el año de competición.

Nuestros resultados sugieren que los jugadores altamente entrenados se adaptan adecuadamente a la producción de especies reactivas de oxígeno después del ejercicio, manteniendo el ciclo enzimático del glutathion y por lo tanto las reservas del mismo.

## 6. Estado inflamatorio

Además de los cambios en los niveles de nitritos, que reflejan un proceso inflamatorio iNOS-dependiente, como resultado de la actividad física se encontró un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$  y el INF $\gamma$ , pero no así del TNF $\alpha$ , que disminuyó como respuesta al ejercicio. Dichos cambios en las interlequinas se asociaron al ejercicio físico *per se*, por lo que nuestros resultados sugieren que los cambios en las citoquinas pro-inflamatorias después del ejercicio pueden reflejar, al menos en parte, el nivel de entrenamiento de los participantes. Se ha demostrado consistentemente que la concentración plasmática de IL-6 aumenta durante el ejercicio muscular. Este aumento es seguido por la aparición del antagonista del receptor IL-1 (IL-1ra) y la citoquina antiinflamatoria IL-10. Las concentraciones de las quimioquinas, IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos  $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), y MIP-1 $\beta$  se elevan después del ejercicio vigoroso. En la mayoría de los estudios relacionados con el ejercicio, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) no cambia (Pedersen y Febbraio, 2008).

La IL-6 se produce y se libera en respuesta a las contracciones musculares. Las fibras musculares expresan IL-6, que posteriormente ejerce sus efectos a nivel local dentro del músculo (por ejemplo, a través de la activación de la AMPK) y, cuando se libera a la circulación periférica, actúa en varios órganos de una manera similar a las

hormonas. Específicamente en el músculo esquelético, la IL-6 actúa en forma de una señal autocrina o paracrina a través del homodímero gp130Rb/IL-6Ra, lo que resulta en la activación de la AMPK y/o la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-quinasa) para aumentar la captación de glucosa y la oxidación de la grasa. Por otra parte, también se sabe que la IL-6 aumenta la producción hepática de glucosa durante el ejercicio o la lipólisis en el tejido adiposo (Pedersen, 2011).

En consecuencia, y a diferencia de lo que ocurría con el estrés oxidativo, el organismo del deportista no es capaz de mantener la respuesta inflamatoria controlada durante el ejercicio, ya que éste dispara dicha respuesta, que vuelve a valores basales una vez el ejercicio disminuye. Nosotros pensamos que el aumento de la respuesta inflamatoria no es solamente un reflejo negativo del ejercicio, si no que de alguna forma participa en los mecanismos de regulación al ejercicio. Efectivamente, además de indicar un daño del músculo esquelético que libera citoquinas proinflamatorias, dichas citoquinas pueden participar, como es sabido en el caso de la IL-6, en mecanismos conducentes a la regulación metabólica y regeneración de la fibra muscular esquelética. Por ello, será necesario profundizar en los efectos que dichas citoquinas producen y observar, en su caso, cómo se comporta el músculo esquelético si se previene la generación de esta reacción inflamatoria.

Si bien una limitación de este estudio ha podido ser la ausencia de un grupo control adecuado, podemos considerar a los jugadores de nuestro estudio como sus propios controles, ya que también fueron estudiados antes y una vez finalizado el ejercicio (etapas de reposo). Podemos decir entonces que los cambios encontrados en nuestro estudio se deben probablemente al propio ejercicio y no a las fluctuaciones normales de las variables estudiadas en los participantes.



## ***VI. CONCLUSIONES***

## *Conclusiones*

1<sup>a</sup>. Los jugadores profesionales de balonmano bien entrenados y sometidos a sesiones de ejercicio y entrenamiento controladas durante un año de competición, experimentan cambios metabólicos, endocrinos y musculares, pronunciados que modifican sus estados de estrés metabólico, oxidativo, e inflamatorio.

2<sup>a</sup>. El estrés metabólico, oxidativo, e inflamatorio que se producen en los jugadores es más evidente en los períodos de mayor actividad física, lo que se evidencia por un aumento en los marcadores de daño muscular y en los parámetros oxidativos e inflamatorios.

3<sup>a</sup>. El ejercicio físico intenso mejora el perfil lipídico de los deportistas durante los períodos de mayor actividad física, lo que habla a favor de la reducción del riesgo cardiovascular como un beneficio del ejercicio físico.

4<sup>a</sup>. Los deportistas bien entrenados son capaces de adaptarse al estrés oxidativo que implica el ejercicio, manteniendo su estado redox intracelular, lo que previene el daño oxidativo que los radicales libres hubieran producido en el organismo de dichos sujetos.

5<sup>a</sup>. Los jugadores, sin embargo, no son capaces de contrarrestar la respuesta inflamatoria, que está elevada durante todo el período de actividad física, disminuyendo a valores basales durante el reposo. Ello, sin embargo, puede indicar que el mantenimiento de esta respuesta inflamatoria elevada participa en mecanismos de regulación celular que, como en el caso de la IL-6, favorece la regeneración de la fibra muscular esquelética.

6<sup>a</sup>. La exposición del organismo a un estrés metabólico, oxidativo e inflamatorio repetido derivado del entrenamiento crónico de alta intensidad, podría conducir a un equilibrio homeostático que controla dichas respuestas y prepara el organismo para las sesiones de entrenamiento posteriores, lo que beneficia el rendimiento de los deportistas.

## *Conclusiones*

## ***VII. BIBLIOGRAFÍA***

## *Bibliografía*

- Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur J A, Cordova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005; 84(1): 1-7.
- Aguilo A, Tauler P, Pilar G M, Villa G, Cordova A, Tur J A, Pons A. Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J Nutr Biochem* 2003; 14(6): 319-325.
- Aikawa K M, Quintanilha A T, de Lumen B O, Brooks G A, Packer L. Exercise endurance-training alters vitamin E tissue levels and red-blood-cell hemolysis in rodents. *Biosci Rep* 1984; 4(3): 253-257.
- Alessio H M, Hagerman A E, Fulkerson B K, Ambrose J, Rice R E, Wiley R L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32(9): 1576-1581.
- Apple F S, Rogers M A, Ivy J L. Creatine kinase isoenzyme MM variants in skeletal muscle and plasma from marathon runners. *Clin Chem* 1986; 32(1 Pt 1): 41-44.
- Arrick B A, Nathan C F. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res* 1984; 44(10): 4224-4232.
- Barton B E. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85(1): 16-20.
- Borg G. A simple rating scale for use in physical work test. *Fysiografiska Sällskapetets y Lund Förhandlingar* 1962; 32: 7-15.
- Borg G. Psychophysical scaling with applications in physical work and the perception of exertion. *Scand J Work En viron Health* 1990; 16: 55-58.
- Branth S, Hambræus L, Piehl-Aulin K, Essen-Gustavsson B, Akerfeldt T, Olsson R, Stridsberg M, Ronquist G. Metabolic stress-like condition can be induced by prolonged strenuous exercise in athletes. *Ups J Med Sci* 2009; 114(1): 12-25.
- Brites F D, Evelson P A, Christiansen M G, Nicol M F, Basilico M J, Wikinski R W, Llesuy S F. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci (Lond)* 1999; 96(4): 381-385.
- Burtis C, Ashwood E, Bruns D. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. fourth edition, 948-949. 2006. Philadelphia
- Chambers D E, Parks D A, Patterson G, Roy R, McCord J M, Yoshida S, Parmley L F, Downey J M. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17(2): 145-152.
- Clarkson P M, Hubal M J. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil* 2002; 81(11 Suppl): S52-S69.
- Clarkson P M, Thompson H S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2 Suppl): 637S-646S.

- Cohen G, Heikkila R E. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 1974; 249(8): 2447-2452.
- Coyle E F, Coggan A R, Hopper M K, Walters T J. Determinants of endurance in well-trained cyclists. *J Appl Physiol* 1988; 64(6): 2622-2630.
- Cuadrado Reyes J. Análisis de la influencia de la intensidad del entrenamiento sobre variables de control de la carga interna en deportes colectivos. 2010. Granada, Spain
- Davies K J, Quintanilha A T, Brooks G A, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107(4): 1198-1205.
- DE Matos L D, Caldeira N D, Perlingeiro P D, Dos Santos I L, Negrao C E, Azevedo L F. Cardiovascular Risk and Clinical Factors in Athletes: 10 Years of Evaluation. *Med Sci Sports Exerc* 2011; 43(6): 943-950.
- Di F S, Sciartilli A, Di V, V, Di B A, Gallina S. The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med* 2009; 39(10): 797-812.
- Echegaray M, Rivera M A. Role of creatine kinase isoenzymes on muscular and cardiorespiratory endurance: genetic and molecular evidence. *Sports Med* 2001; 31(13): 919-934.
- Egermann M, Brocai D, Lill C A, Schmitt H. Analysis of injuries in long-distance triathletes. *Int J Sports Med* 2003; 24(4): 271-276.
- Elsbach P, Weiss J. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol Lett* 1985; 11(3-4): 159-163.
- Escames G, Leon J, Macias M, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; 17(8): 932-934.
- Esterbauer H, Cheeseman K H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.
- Fallon K E, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med* 1999; 33(4): 264-269.
- Febbraio M A, Dancy J. Skeletal muscle energy metabolism during prolonged, fatiguing exercise. *J Appl Physiol* 1999; 87(6): 2341-2347.
- Febbraio M A, Pedersen B K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 2002; 16(11): 1335-1347.
- Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause S W, Kreutz M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007; 109(9): 3812-3819.

- Fisher-Wellman K, Bloomer R J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 2009; 8: 1.
- Gamble P. Periodization of training for team sports athletes. *Strength & Conditioning Journal*, 2006; 28(5): 56-66.
- García-Verdugo M. Planificación y control del entrenamiento de resistencia. Badalona: 2008.
- Gil Hernández A. Tratado de Nutrición . 2005.
- Goldberg L, Elliot D L. The effect of exercise on lipid metabolism in men and women. *Sports Med* 1987; 4(5): 307-321.
- Granger D L, Taintor R R. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. *Methods in enzymology* 1995; 7: 78-83.
- Griess P. *Ber Dtsch Chem Ges* 1879; 12: 426-428.
- Griffiths H R. The influence of diet on protein oxidation. *Nutr Res Rev* 2002; 15(1): 3-17.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. Antioxidant defences. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Ed. Clarendon Press). Oxford: 1999; 3: 200-216.
- Hernández J. Fundamentos del deporte. Análisis de las estructuras del juego deportivo. Barcelona 1998.
- Herrero JA, Cuadrado G. Propuesta de planificación de la condición física en el baloncesto mediante el modelo ATR. 18[3], 21-29. 2004.
- Hissin P J, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74(1): 214-226.
- Jammes Y, Steinberg J G, Bregeon F, Delliaux S. The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 144(1): 81-90.
- Jaskot R H, Charlet E G, Grose E C, Grady M A, Roycroft J H. An automated analysis of glutathione peroxidase, S-transferase, and reductase activity in animal tissue. *J Anal Toxicol* 1983; 7(2): 86-88.
- Ji L L, Fu R, Mitchell E W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* 1992; 73(5): 1854-1859.
- Ji L L, Gomez-Cabrera M C, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067: 425-435.
- Jonsdottir I H, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter E A, Pedersen B K. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol* 2000; 528 Pt 1: 157-163.

- Katzmarzyk P T, Leon A S, Rankinen T, Gagnon J, Skinner J S, Wilmore J H, Rao D C, Bouchard C. Changes in blood lipids consequent to aerobic exercise training related to changes in body fatness and aerobic fitness. *Metabolism* 2001; 50(7): 841-848.
- Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen B K, Neufer P D. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J* 2001; 15(14): 2748-2750.
- Kim H G, Hong S J, Park H J. Age-related changes in the activity of antioxidant and redox enzymes in rats. *Mol Cells* 2003; 16: 78-284.
- Kin N W, Sanders V M. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol* 2006; 79(6): 1093-1104.
- Kraus W E, Houmard J A, Duscha B D, Knetzger K J, Wharton M B, McCartney J S, Bales C W, Henes S, Samsa G P, Otvos J D, Kulkarni K R, Slentz C A. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 2002; 347(19): 1483-1492.
- Kyparos A, Vrabas I S, Nikolaidis M G, Riganas C S, Kouretas D. Increased oxidative stress blood markers in well-trained rowers following two thousand-meter rowing ergometer race. *J Strength Cond Res* 2009; 23(5): 1418-1426.
- Lac G, Maso F. Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52(1): 43-49.
- Lawrence R A, Burk R F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71(4): 952-958.
- Leon A S, Sanchez O A. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(6 Suppl): S502-S515.
- López Chicharro J, Fernández Vaquero A. *Fisiología del ejercicio*. Buenos Aires; Madrid 2006.
- MacNeil B J, Jansen A H, Greenberg A H, Nance D M. Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. *Am J Physiol* 1996; 270(1 Pt 2): R264-R270.
- Margonis K, Fatouros I G, Jamurtas A Z, Nikolaidis M G, Douroudos I, Chatzinikolaou A, Mitrakou A, Mastorakos G, Papassotiriou I, Taxildaris K, Kouretas D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(6): 901-910.
- Market M, Andrew P C, B B M. Measurement of superoxide production by human neutrophils. *Methods Enzimol* 1984; 105: 358-365.
- Martarelli D, Pompei P. Oxidative stress and antioxidant changes during a 24-hours mountain bike endurance exercise in master athletes. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 2009; 49: 122-127.

- Martinez A C, Seco C J, Tur Mari J A, Abecia Inc, Orella E E, Biescas A P. Testosterone and cortisol changes in professional basketball players through a season competition. *J Strength Cond Res* 2010; 24(4): 1102-1108.
- Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 1997; 37: 235-239.
- Matveiev L. *Fundamentos del entrenamiento deportivo*. Moscú 1985.
- McCord J M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312(3): 159-163.
- McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244(22): 6049-6055.
- Mestre J A. *Planificación deportiva*. Barcelona 1995.
- Meydani M, Evans W J, Handelman G, Biddle L, Fielding R A, Meydani S N, Burrill J, Fiatarone M A, Blumberg J B, Cannon J G. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am J Physiol* 1993; 264(5 Pt 2): R992-R998.
- Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, Satoh S, Niwa M, Senoh H, Fujiwara H. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med* 1994; 179(5): 1529-1537.
- Nakatani K, Komatsu M, Kato T, Yamanaka T, Takekura H, Wagatsuma A, Aoyama K, Xu B, Hirano T, Kasai H, Ando S, Takeuchi T. Habitual exercise induced resistance to oxidative stress. *Free Radic Res* 2005; 39(9): 905-911.
- Netea M G, Drenth J P, De B N, Hijmans A, Keuter M, Dharmana E, Demacker P N, Van der Meer J W. A semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method for measurement of mRNA for TNF-alpha and IL-1 beta in whole blood cultures: its application in typhoid fever and excentric exercise. *Cytokine* 1996; 8(9): 739-744.
- Nieman D C, Davis J M, Henson D A, Walberg-Rankin J, Shute M, Dumke C L, Utter A C, Vinci D M, Carson J A, Brown A, Lee W J, McAnulty S R, McAnulty L S. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *J Appl Physiol* 2003; 94(5): 1917-1925.
- Oostenbrug G S, Mensink R P, Bar F W, Hornstra G. Lipid peroxidation-associated oxidative stress during percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(1-2): 129-136.
- Ortega F B, Ruiz J R, Gutierrez A, Castillo M J. Extreme mountain bike challenges may induce sub-clinical myocardial damage. *J Sports Med Phys Fitness* 2006; 46(3): 489-493.

- Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen B K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol* 1998; 508 (Pt 3): 949-953.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333(1): 19-39.
- Pedersen B K. Anti-inflammation--just another word for anti-ageing? *J Physiol* 2009; 587(Pt 23): 5515.
- Pedersen B K. Muscles and their myokines. *J Exp Biol* 2011; 214(Pt 2): 337-346.
- Pedersen B K, Febbraio M A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 2008; 88(4): 1379-1406.
- Pedersen B K, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000; 80(3): 1055-1081.
- Pedersen B K, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol* 2001; 536(Pt 2): 329-337.
- Pepe H, Balci S S, Revan S, Akalin P P, Kurtoglu F. Comparison of oxidative stress and antioxidant capacity before and after running exercises in both sexes. *Gender Medicine* 2009; 6(4): 587-595.
- Petersen A M, Pedersen B K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; 98(4): 1154-1162.
- Pilegaard H, Ordway G A, Saltin B, Neufer P D. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(4): E806-E814.
- Platonov V N. Teoría general del entrenamiento deportivo Olímpico. Barcelona 2001.
- Quintanilha A T, Packer L. Vitamin E, physical exercise and tissue oxidative damage. *Ciba Found Symp* 1983; 101: 56-69.
- Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2000; 376(2): 248-251.
- Radom-Aizik S, Leu S Y, Cooper D M, Zaldivar F, Jr. Serum from exercising humans suppresses t-cell cytokine production. *Cytokine* 2007; 40(2): 75-81.
- Rassaf T, Lauer T, Heiss C, Balzer J, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Drexhage C, Meyer C, Kelm M. Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity. *Br J Sports Med* 2007; 41(10): 669-673.
- Reid M B. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90(2): 724-731.

- Rodriguez M I, Escames G, Lopez L C, Lopez A, Garcia J A, Ortiz F, Sanchez V, Romeu M, Acuna-Castroviejo D. Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp Gerontol* 2008; 43(8): 749-756.
- Ruiz J R, Mesa J L, Mingorance I, Rodriguez-Cuartero A, Castillo M J. [Sports requiring stressful physical exertion cause abnormalities in plasma lipid profile]. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57(6): 499-506.
- Ruiz J R, Ortega F B, Castillo M J, Gutierrez A, Agil A. Increased susceptibility to plasma lipid peroxidation in untrained subjects after an extreme mountain bike challenge at moderate altitude. *Int J Sports Med* 2006; 27(7): 587-589.
- Rusanova I. Determinación de los haplotipos de anemia falciforme y su correlación con los niveles de estrés oxidativo en pacientes de 6 meses a 15 años de edad en Panamá. 2010.
- Sacheck J M, Cannon J G, Hamada K, Vannier E, Blumberg J B, Roubenoff R. Age-related loss of associations between acute exercise-induced IL-6 and oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291(2): E340-E349.
- Sanchez-Bañuelos F. Bases teóricas y funcionales del ARD. Conceptos, Requisitos y Condicionantes. 1994.
- Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark S C, Dinarello C A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75(1): 40-47.
- Schippinger G, Wonisch W, Abuja P M, Fankhauser F, Winklhofer-Roob B M, Halwachs G. Lipid peroxidation and antioxidant status in professional American football players during competition. *Eur J Clin Invest* 2002; 32(9): 686-692.
- Seirul-lo Vargas F. Planificación a Largo Plazo en los Deportes Colectivos. Curso sobre Entrenamiento Deportivo en la Infancia y la Adolescencia. Escuela Canaria del Deporte. Dirección General de Deportes del Gobierno de Canarias. /articulos/concepto\_planificacion\_deportes\_colectivos\_seirul\_lo\_pdf [serial online] 1998. Available from <http://www.entrenamientodeportivo.org>.
- Serrano Corro EJ. Estudio multivariable sobre actividad física, estrés oxidativo, inflamación y daño muscular. 2009.
- Serrano E, Venegas C, Escames G, Sanchez-Munoz C, Zabala M, Puertas A, de Haro T., Gutierrez A, Castillo M, Acuna-Castroviejo D. Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition. *J Sports Sci* 2010; 28(10): 1047-1056.
- Shepherd A J, Beresford L J, Bell E B, Miyan J A. Mobilisation of specific T cells from lymph nodes in contact sensitivity requires substance P. *J Neuroimmunol* 2005; 164(1-2): 115-123.

- Siegel A J, Sholar M, Yang J, Dhanak E, Lewandrowski K B. Elevated serum cardiac markers in asymptomatic marathon runners after competition: is the myocardium stunned? *Cardiology* 1997; 88(6): 487-491.
- Siesjo B K, Bendek G, Koide T, Westerberg E, Wieloch T. Influence of acidosis on lipid peroxidation in brain tissues in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985; 5(2): 253-258.
- Smith D J, Roberts D. Effects of high volume and/or intense exercise on selected blood chemistry parameters. *Clin Biochem* 1994; 27(6): 435-440.
- Starkie R L, Angus D J, Rolland J, Hargreaves M, Febbraio M A. Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *J Physiol* 2000; 528(Pt 3): 647-655.
- Starkie R L, Rolland J, Angus D J, Anderson M J, Febbraio M A. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(4): C769-C774.
- Steensberg A, Fischer C P, Keller C, Moller K, Pedersen B K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285(2): E433-E437.
- Steensberg A, Keller C, Starkie R L, Osada T, Febbraio M A, Pedersen B K. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(6): E1272-E1278.
- Steensberg A, van H G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund P B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* 2000; 529 Pt 1: 237-242.
- Suzuki K, akaji S, amada M. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics Exerc Immunol Rev* 2002; 8: 6-48.
- Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, Yamada M, Kudoh S, Liu Q, Sugawara K, Yamaya K, Sato K. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol* 1999; 87(4): 1360-1367.
- Tarpenning KM, Wiswell RA, Hawkins SA, Marcell TJ. Influence of weight training exercise and modification of hormonal response on skeletal muscle growth. *J Sci Med Sport* 2001; 4(4): 431-446.
- Teixeira V, Valente H, Casal S, Marques F, Moreira P. Antioxidant status, oxidative stress, and damage in elite trained kayakers and canoeists and sedentary controls. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2009; 19(5): 443-456.
- Tian Y, Tong T K, Lippi G, Huang C, Shi Q, Nie J. Renal function parameters during early and late recovery periods following an all-out 21-km run in trained adolescent runners. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(6): 993-997.
- Toborek M, Hennig B. Fatty acid-mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 1994; 59(1): 60-65.

- Tous J. Nuevas tendencias en fuerza y musculación. Barcelona 1999.
- Tremblay MS, Copeland JL, and Helder W. Effect of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men. *J Appl Physiol* 2004; 96(2): 531-539.
- Ullum H, Haahr P M, Diamant M, Palmo J, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen B K. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol* 1994; 77(1): 93-97.
- Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med* 1995; 20(4): 251-276.
- Van Hall G, Jensen-Urstad M, R H. Leg and arm lactate and substrate kinetics during exercise. *Am J Physiol* 2003; 284: E193-E205.
- Vasconcelos A. Planificación y organización del entrenamiento deportivo. Barcelona 2000.
- Vassilakopoulos T, Karatza M H, Katsaounou P, Kollintza A, Zakyntinos S, Roussos C. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J Appl Physiol* 2003; 94(3): 1025-1032.
- Venditti P, Di M S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med* 1997; 18(7): 497-502.
- Verjoshanski I V. Entrenamiento deportivo. Planificación y programación. Barcelona 1990.
- Viguie C A, Frei B, Shigenaga M K, Ames B N, Packer L, Brooks G A. Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* 1993; 75(2): 566-572.
- Wallace M B, Cardinale M. Conditioning for team handball. *Strength & Conditioning* 1997;(December): 7-12.
- Wang J S, Lee T, Chow S E. Role of exercise intensities in oxidized low-density lipoprotein-mediated redox status of monocyte in men. *J Appl Physiol* 2006; 101(3): 740-744.
- Wong P K, Quinn J M, Sims N A. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 158-168.
- Wonisch W, Kohlwein S D, Schaur J, Tatzber F, Guttenberger H, Zarkovic N, Winkler R, Esterbauer H. Treatment of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the lipid peroxidation product 4-HNE provokes a temporary cell cycle arrest in G1 phase. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(6): 682-687.

- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei X F, Achong M K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101(2): 311-320.
- Yan B, A J, Wang G, Lu H, Huang X, Liu Y, Zha W, Hao H, Zhang Y, Liu L, Gu S, Huang Q, Zheng Y, Sun J. Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training. *J Appl Physiol* 2009; 106(2): 531-538.
- Zanella A M, Nakazone M A, Pinhel M A, Souza D R. Lipid profile, apolipoprotein A-I and oxidative stress in professional footballers, sedentary individuals, and their relatives. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011; 55(2): 121-126.
- Zembron-Lacny A, Slowinska-Lisowska M, Ziemia A. Integration of the thiol redox status with cytokine response to physical training in professional basketball players. *Physiol Res* 2010; 59(2): 239-245.
- Zintl F. Entrenamiento de la resistencia. Fundamentos, métodos y dirección del entrenamiento. Barcelona 1991.

## *Bibliografía*

***ANEXOS***



## REVIEW ARTICLE

## Exercise and melatonin in humans: reciprocal benefits

**Abstract:** The aim of this review is to update the reader as to the association between physical exercise and melatonin, and to clarify how the melatonin rhythm may be affected by different types of exercise. Exercise may act as a zeitgeber, although the effects of exercise on the human circadian system are only now being explored. Depending on the time of the day, on the intensity of light, and on the proximity of the exercise to the onset or decline of the circadian production of melatonin, the consequence of exercise on the melatonin rhythm varies. Moreover, especially strenuous exercise per se induces an increased oxidative stress that in turn may affect melatonin levels in the peripheral circulation because indole is rapidly used to combat free radical damage. On the other hand, melatonin also may influence physical performance, and thus, there are mutually interactions between exercise and melatonin production which may be beneficial.

**Germaine Escames<sup>1,2</sup>, Guler Ozturk<sup>3</sup>, Beatriz Baño-Otálora<sup>4</sup>, María J. Pozo<sup>5</sup>, Juan A. Madrid<sup>4</sup>, Russel J. Reiter<sup>6</sup>, Eric Serrano<sup>1,2</sup>, Melquiades Concepción<sup>1,2</sup> and Dario Acuña-Castroviejo<sup>1,2,7</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Granada, Spain;

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain; <sup>3</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Maltepe University, Istanbul, Turkey; <sup>4</sup>Chronobiology Laboratory, Department of Physiology, Faculty of Biology, University of Murcia, Spain; <sup>5</sup>Department of Physiology, Nursing School, University of Extremadura, Cáceres, Spain; <sup>6</sup>Department of Cellular and Structural Biology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; <sup>7</sup>Laboratorio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

**Key words:** biological clock, melatonin circadian rhythm, physical exercise

Address reprint requests to Darío Acuña-Castroviejo, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.  
E-mail: dacuna@ugr.es

Received June 14, 2011;

Accepted July 18, 2011.

### Structure and function of the human circadian system

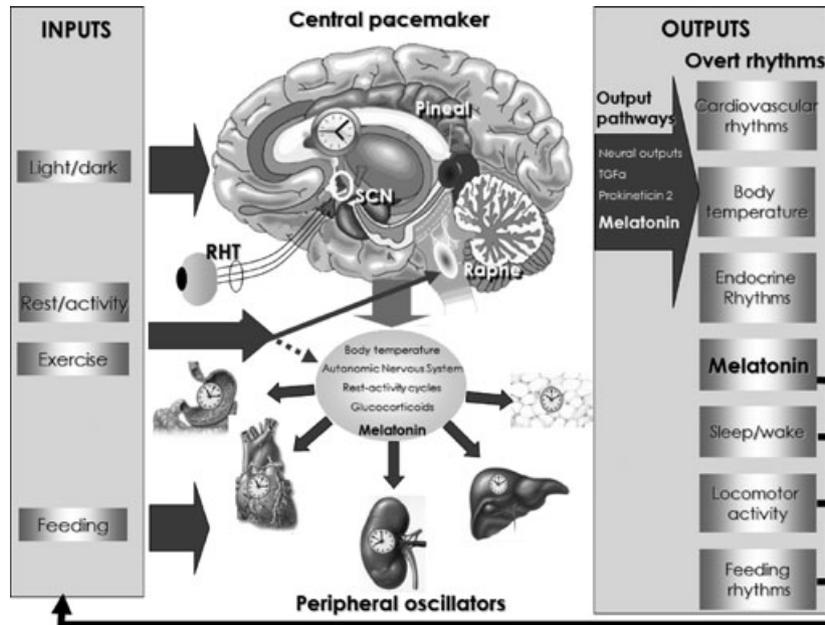
Most organisms, from cyanobacteria to humans, display rhythms in their physiology and behavior that are synchronized to environmental cycles of 24 hr. These rhythms are known as circadian rhythms. To generate this rhythmicity, organisms are provided with a time measuring device, known as the circadian timekeeping system. In humans, the circadian system is composed of a hierarchical network of structures responsible for the generation of circadian rhythms which keep cellular clocks synchronized with the daily environmental cycles (Fig. 1), especially the photo-period.

In mammals, the main circadian pacemaker is located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus where each individual neuron can independently generate a self-sustained circadian rhythm. These rhythms are generated by a molecular clock based on complex cycles of

transcription, translation, protein–protein interaction, phosphorylation, nuclear translocation, and protein degradation, all of which impose a delay to create a coordinated molecular cycle that matches the 24-hr environmental LD period [1].

The basic loop of the molecular clock is composed of two positive elements, CLOCK and BMAL1, which dimerize to activate rhythmic transcription of *Per* and *Cry* genes by binding to specific promoter elements. After translation, PER and CRY proteins dimerize and undergo nuclear translocation to inhibit the coupling of CLOCK:BMAL1, resulting in decreased transcription of *Per* and *Cry* genes. This molecular clock also regulates the expression of several clock-controlled genes (3–15%), which are not a part of the main clock machinery but are responsible for the generation of circadian rhythmicity in many physiological processes [2].

Recently, the molecular clock has been also reported in many peripheral tissues and organs such as, adipose tissue,



*Fig. 1.* General view of the role of melatonin and physical exercise on circadian system organization. The human circadian system consists of three major components: circadian clocks, inputs, and outputs (overt rhythms and output pathways). The main circadian pacemaker is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus. It sends temporal information through humoral signals such as transforming growth factor, prokineticin-2, glucocorticoids and melatonin, via direct neural outputs and by temperature cycles to generate the majority of overt rhythms which are measured in the organism. In addition, some of these signals are used to synchronize the activity of peripheral oscillators in virtually all cells and tissues. As neither this central pacemaker nor peripheral oscillators are able to generate rhythms with an exact period of 24 hr, they must be entrained every day to a 24-hr cycle by periodical inputs from environmental time cues (synchronizers or zeitgebers). Among these, the light/dark cycle is the main zeitgeber for SCN, and food availability for some peripheral oscillators. Physical exercise may entrain the SCN and thereafter the melatonin rhythm; exercise entrainment of the SCN involves serotonergic input from the raphe nucleus. In addition, exercise may modify some rhythms by masking the activity of peripheral oscillators, such as those in the liver and heart. In humans, some of the output rhythms can be modified voluntarily, as occurs with melatonin (by its exogenous administration), sleep–wake cycle, locomotor activity, and feeding time. Therefore, these output rhythms are, in turn, able to feedback onto circadian clocks to modify their phases and amplitudes. Melatonin plays a key role in the circadian system. Its synthesis is under the control of the SCN through a sympathetic pathway which releases norepinephrine on the pinealocytes during the night. Nocturnal light exposure, of appropriate intensity and spectrum, inhibits melatonin synthesis.

liver, heart, suprarenal, pancreas, all of them known as peripheral circadian oscillators [3, 4]. Currently, it is thought that circadian oscillators are functional in most, if not all, body cells [2]. Under normal physiological conditions, peripheral oscillators are synchronized by the activity of the central pacemaker, the SCN. However, under certain situations, these oscillators can desynchronize from the SCN control generating a situation of circadian misalignment, known as chronodisruption [5–7].

When isolated from environmental cues, both the central pacemaker and the peripheral oscillators exhibit circadian rhythms with periods slightly different from 24 hr; thus, they need regular periodic input from environmental time cues (zeitgebers or synchronizers) to maintain their activity entrained to 24 hr. Among these inputs, the 24-hr light–dark cycle is the main zeitgeber for the SCN; however, humans can also use other nonphotic zeitgebers, including scheduling of rest and activity, meal time and social contacts as useful ‘time-giver’.

The synchronized activity of SCN cells communicates circadian phase information through neural and humoral signals to every cell in the organism. The autonomic nervous system and the melatonin and core body temperature rhythms are well-known output signals from SCN to

generate circadian rhythms in most physiological and behavioral variables. However, as humans can modify voluntarily some of these output rhythms, for example, meal time, rest activity or physical exercise, these outputs can also act as input signals which, in turn, modify the activity of the central and peripheral clocks. Moreover, the central pacemaker and peripheral oscillators respond to different zeitgebers; for example, the liver is synchronized by food restriction but not the SCN, which responds mainly to light. These features of human circadian system make the interpretations of results from human studies more complicated.

### Physical exercise as a synchronizer of the circadian system

Contrary to light, the mechanisms involved in the synchronization by nonphotic time-cues, such as physical exercise, are less well understood. In recent years, there has been a growing interest in physical exercise as a nonphotic signal to entrain the human circadian clock. In addition to its clear health benefits, physical exercise is a preferred method, over pharmaceutical interventions, to synchronize the circadian system. Under certain conditions, scheduled

physical exercise significantly phase delays the human circadian pacemaker [8–10], which may help to facilitate circadian adaptation to schedules requiring a delay in the sleep–wake cycle such as in clock-wise rotating shift work [11, 12]. In addition, some studies show that physical exercise can accelerate the re-entrainment of the human sleep–wake rhythm to an acutely shifted sleep–wake cycle [13, 14], supporting its application as a treatment for circadian rhythm misalignments resulting from jet-lag or shift-work as an example.

Animals studies demonstrate that vigorous wheel running exercise, even when it is unscheduled, prevents the loss of rhythmicity in rats maintained under constant light (a condition which induces arrhythmicity in this species) and accelerates the emergence of circadian pattern in arrhythmic animals moved to dim light. Physical exercise promotes stronger coupling in the multioscillatory circadian system [15]. In addition, in some diurnal rodent species such as *Octodon degus* and *Arvicanthis niloticus*, the availability of a wheel in the cage can induce a phase inversion, from diurnal to nocturnal behavior. The mechanism by which physical exercise induces nocturnalism should be located downstream from the clock [16–18].

The effects of physical exercise on the circadian system, however, require medium-to-long-term repeated training. In a pioneering study, Van Someren et al. [19] administered a 3-month training program to healthy elderly men. He reported that fitness training induced a significant reduction in the fragmentation of their rest-phase rhythm. Fragmented rhythms are characteristics of aging and neurodegenerative diseases such as Alzheimer or Parkinson diseases; thus, scheduled physical exercise can be used to improve some negative symptoms associated with these debilitating conditions [20].

The actual usefulness of physical exercise as a chronobiotic in humans is still unclear and results are controversial. One reason is that studies investigating the effects of exercise on circadian rhythmicity are hampered by the lack of controls for competing zeitgebers, such as light and athletic status (sedentary individuals to Olympic athletes) [21]. In fact, there are reports showing that rhythm amplitudes of physically fit subjects tend to be higher than in unfit individuals [22]. Thus, standardization of these factors is necessary before any firm conclusion can be drawn regarding the effects of exercise on the human circadian system. Nevertheless, there is growing evidence that physical exercise of varied duration and intensity can cause phase shifts that are independent of those produced by light [11].

In summary, a review of the references on rest-activity schedules and physical exercise suggests that a combination of both of them can be used to potentiate the entrainment of the circadian system. Rest-activity schedules alone can entrain the SCN but in a very narrow range of periods around 24 hr. Physical exercise can induce larger effects and, as a consequence, it might expand this range. However, the fact that only some blind people, without circadian photoreception, remain entrained to 24 hr suggest that nonphotic cues, including physical activity, should be considered as weak zeitgebers compared with light–dark cycle [23].

## The effect of physical exercise on melatonin production

One of the main disadvantages in assessing the synchronizing effect of exercise on the human circadian system is the inability to directly measure its phase-shifting effects of the central pacemaker. Instead, the levels of one of the main output signals of the clock, melatonin, are commonly used to report the phase-shifting effects of exercise on the circadian clock. In addition, acute and chronic physical exercise also modifies plasma melatonin levels.

In this regard, there is some controversy about the effects of physical activity on the endogenous profile of melatonin secretion. It has been shown that melatonin levels increase [24–26], decrease [27, 28], or remain unaffected by exercise [13, 29]. Such conflicting findings may be due to differences in lighting conditions and the time of day at which the study subjects exercised [30]. Moreover, there is a mixture of applied and basic research on this topic. Applied researchers are interested in whether exercise can help people during rhythm disturbances; but this question still remains to be answered [21]. There is now evidence that exercise of quite varied durations and intensities can mediate phase shifts in rhythms in secretory products, independent from those of light, in populations differing widely in athletic status and age [21].

## Effects of physical exercise on the phase of melatonin rhythm

Three markers of phase from the diurnal profile of melatonin are currently used: the onset of the rise (dim light melatonin onset, DLMO), the time of peak, and the offset of melatonin secretion. Although melatonin is a good marker of clock phase (currently considered as the ‘gold’ standard marker of circadian system), it is difficult to eliminate confounding variables that can affect its synthesis and release following physical exercise. For example, it is well known that nocturnal melatonin synthesis is greatly inhibited by light [31]. So, the time of day (presence or absence of light) at which the effect of exercise on phase shift is assessed is important. These ‘masking’ effects can produce false interpretation of the results and/or inconsistencies between studies, but research strategies are now in place to minimize these confounding factors.

Despite the inconsistencies mentioned earlier, there is a general consensus that night-time exercise, whether of moderate or high intensity, under a constant routine results in phase delays in melatonin onset [8–10]. Barger et al. [11] also reported this phase-delay effects of nocturnal exercise on the melatonin rhythm when exercise was performed in the dark or under very dim light. There is also agreement that, on average, the difference in phase shift between the nocturnal exercise and control conditions was similar between the young versus older participants, suggesting that age does not influence the sensitivity of circadian rhythms to exercise [8].

Reports of exercise-induced phase advances in the melatonin rhythm are more rare. Of the few studies that have been published, phase advances were reported when exercise was performed in the morning compared with

evening [13]. These studies have been criticized as the phase advance observed in these subjects may be due to morning sunlight exposure (light suppressing effects on melatonin synthesis), and are not because of exercise carried out at this time. Recently, a clear phase advance in response to a single bout (1 hr) of exercise has been reported [32]. In this study, five groups [(morning, afternoon, evening, night, and control (no-exercise))] were investigated. The mean timing of the onset of melatonin secretion was  $22:45 \pm 01:11$  hr. Analysis of the phase-response curve (PRC) of melatonin showed a crossover point between delays and advances at approximately 12 hr after melatonin onset [32]. Unlike with exposure to bright light, phase advances in melatonin rhythm were found when exercise was done between 18 and 21 hr after melatonin onset (from noon to evening). The question as to why exercise and light have different phase response curve (PRC) deserves further research.

Most results reporting exercise as a zeitgeber have come from studies in which participants undertook a single bout of exercise followed by a single estimate of clock phase. Buxton et al. [32] measured the melatonin rhythm in three circadian cycles after bouts of exercise were performed in the evening, and found that apparent phase advances of  $30 \pm 15$  min between day 1 and 2 become delays of  $66 \pm 9$  min after day 3. This shows the complex relationship between exercise and phase shifting, and strengthens the argument that although shifts are initially small, cumulatively they can become substantial if exercise is performed regularly.

### Influence of physical exercise on melatonin levels

Accumulating evidence suggests that in addition to its phase-shifting effects, exercise can acutely alter melatonin levels as well [33]. Although most studies show that plasma melatonin levels increase shortly and transiently after exercise [34–36], a decrease or no change in melatonin secretion after exercise have been also reported [27, 28]. This variability in exercise-induced acute response on melatonin release could be dependent on the circadian phase at which exercise was undertaken [32]. Inter-study differences in light conditions (presence or absence of bright light), and the type, duration, intensity of exercise, as well as melatonin sampling sites (saliva versus plasma) and its measurement methods (RIA versus ELISA) also impinged on the outcomes [37].

A clearer observation seems to be that the acute increase in circulating melatonin that occurs after an exercise bout is attenuated by regular and vigorous training. In woman subjected to a conditioning (running) program, the acute peak of melatonin in response to treadmill exercise decreased by 52% as training progressed [26]. Although the exact physiological relevance of the acute rise in plasma melatonin induced by exercise is not known, it may be advantageous to the organism given that, at least strenuous exercise generates oxidative stress and melatonin is a potent antioxidant capable of protecting against potential molecular damage [38, 39].

In normal volunteers, it was found that melatonin level increased immediately after exercise and returned to pre-exercise levels 1 hr after physical exertion [24]. In training

subjects, morning 6-sulfatoxymelatonin levels before competition started in professional male cyclists were higher than those collected in the evening [9, 40]. However, evening levels of 6-sulfatoxymelatonin during 3 wk of a tour race were higher than morning levels. On the other hand, both morning and evening 6-sulfatoxymelatonin levels decreased during the 3 wk of the tour race [40]. It was recently reported that after 4 days of competition, well-trained cyclists show an adaptative response to physical overloads, regulating efficiently their oxidative stress, and increasing the diurnal melatonin levels [41]. Interestingly, urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin did not change significantly. It seems that whereas training does not cause any chronic change in melatonin secretion, physical exercise increases melatonin in the blood temporarily [36]. Together, these data suggest that the melatonin rise in response to extenuated exercise is metabolized through oxidative pathways to metabolites others than 6-sulfatoxymelatonin, for example, to *N*1-acetyl-methyl-*N*2-formyl-5-methoxykynuramine [42]. Thus, urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion may be not useful to evaluate melatonin changes in exercise. Working with sled dogs, a dog strain that can be considered elite athletes, Dunlap et al. [43] reported a reduction in melatonin levels after exercise in both winter and summer seasons in dogs raised in Alaska, but only a reduction in winter in sled dogs raised in New York. These data also account for seasonal variations in exercise-dependent melatonin changes.

Further complexities in assessing the melatonin response to exercise arise from the hypothesis that changes in melatonin levels might depend on the initial concentration of systemic melatonin. That is, exercise conducted when melatonin levels are already high results in a further increase in its levels. For example, results from Monteleone et al. [27] show that in late evening (22:40 hr) exercise, in the rising phase of melatonin secretion, may blunt melatonin levels, whereas Buxton et al. [9] reported that high-intensity exercise during the night-time (01:00 hr) period, when melatonin levels are already elevated, was associated with an acute increase in melatonin concentrations. However, again there is contrasting evidence showing inconsistent [10] or no [9] immediate effects of 3 hr moderate intensity exercise on melatonin concentrations at the same circadian phases. A later study [32] also failed to show an acute increase in melatonin secretion following morning and afternoon exercise. Although the mechanism underpinning the possible acute alteration in melatonin concentration following exercise remained unknown, a recent report confirmed that the absolute rise in melatonin levels following exercise was greatest and more pronounced in the morning than in the afternoon [44].

It is known that subjecting animals to stress results in an alteration in endocrine physiology. This stress could induce an elevation in plasma melatonin in humans, especially in athletes during performance or endurance training. Bullen et al. [45] suggested that these exercise-enhanced melatonin levels may have severe health consequences, contributing to impairment of reproductive function in women engaging in endurance sports. This seems unlikely as suppression of reproductive physiology by melatonin in humans has not been reliably documented. Other studies indicate that

professional road cyclist display an adaptive response to the physical overloads during competitive events [41]. It is believed that this adaptive strategy allows them to efficiently regulate intracellular oxidative stress and prevent an exacerbation of pro-inflammatory cytokine induction. After competition, an increase in plasma melatonin concentration is also detected. Because melatonin is known to have anti-oxidative properties [46], an increase in its level can provide a modulatory role in adaptive stress responses, offering protective actions against free radical-mediated damage.

### Coupling mechanisms between exercise and melatonin

Exercise is known to impact on many of the body's homeostatic systems, including the stress response. Daily variation in melatonin synthesis is controlled by norepinephrine secreted by the postganglionic sympathetic nerves that innervate the pineal gland [47]. Exercise caused a marked increase in the activity of the sympathetic nervous system and catecholamine secretion [48]. This increased activity in the sympathetic nervous system could potentially modulate melatonin secretion. In the human, this rise in melatonin secretion could cause a net phase-shifting effect, via the pineal gland, by acting directly on SCN cells, which express receptors for melatonin [49].

Besides this stress-mediated effect of exercise on the pineal gland, two other input signals induced by physical exercise could be responsible for the entraining effect of physical exercise on the SCN and, thus, on the melatonin rhythm [50]. The first pathway allows the integration of photic (mediated by the retinohypothalamic tract) and nonphotic inputs originating in the midbrain raphe nuclei (MRN). Physical activity stimulates the raphe which in turn activates serotonergic input to the intergeniculate leaflets (IGL). The IGL communicates this signal to SCN via neuropeptide Y release. The second important afferent input to the master pacemaker comes directly from MRN. The activity of serotonergic neurons from the MRN is arousal dependent as serotonin levels in the SCN follow the daily pattern of locomotor activity, both in nocturnal and diurnal rodents [16].

Exercise has positive effects on mood and anxiety [51–54]. How daily exercise affects mood is not known exactly. Some hormones, for example, glucocorticoids and several neuro-transmitters, for example, serotonin, norepinephrine, which are altered during both psychological and physical stresses, may play an important role in mood after exercise [51]. Exercise may be involved in mood improvement by resetting the master circadian pacemaker via these serotonergic inputs. Serotonin provides both direct and indirect inputs to the SCN and it is involved in the effects of physical activity on the clock [51].

The molecular mechanisms coupling acute exercise or serotonergic receptor activation during the mid-subjective day in nocturnal rodents are associated with the suppression of *Per* expression. This suppression is associated with large phase advances when serotonin agonists are administered during subjective day. However, the levels of mRNA of *Per 1*, *Per 2*, *Rev-Erb $\alpha$*  and  $\beta$  and *Ror $\alpha$*  and  $\beta$  are not

modified by serotonergic activation within the SCN of a diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei* [55]. Further research is needed to understand the mechanism by which physical exercise can induce circadian system synchronization and modifies melatonin levels.

### Melatonin and physical performance

Any one undertaking exercise needs to provide a sustained high oxygen delivery to the working muscles, including those related to respiration. In elite athletes, this is achieved to a large extent by the ability to increase cardiac output, together with adaptations in the trained muscles and amelioration of the deleterious effects of exercise-related oxidative stress. Herein, we will describe melatonin effects that could improve physical performance.

#### Effects on cardiovascular system

The increase in cardiac output can be attributed to an rise in maximal stroke volume enabled by having an enlarged left ventricle as a result of prolonged periods of endurance training [56]. In addition, it is totally accepted that the onset of exercise is associated with changes in the cardiovascular system (increase in the heart rate and vasoconstriction except in working muscles) that are a consequence of a withdrawal of cardiac vagal tone [57] and an increasing effect of cardiac sympathetic acceleratory nerves [58]. These changes are activated by central motor command and by afferent fibers from exercising muscles sensitive to distortion or stretch (type III) or to metabolic products (type 4; review in [59]).

As it has been pointed out earlier, a relationship between melatonin and exercise is supported by the fact that catecholamine secretion is markedly elevated during physical exercise [48]. Cardiovascular effects of exogenous and endogenous melatonin could favor exercise performance. Thus, intravenous administration of melatonin in the baboon increases the cardiac output and left ventricular ejection fraction, which implies a positive inotropic action on the heart by melatonin that could increase cardiac output [60]. Measurements of salivary melatonin concentration during and after exercise show that the gradient of the heart rate–melatonin relationship is steeper in the morning than in the afternoon [44]. Taking into account that the absolute increase in melatonin was greater in the morning when the circulating levels of the indoleamine are higher, these results raise the possibility that circulating melatonin favors the increase in cardiac output during exercise and that the time of day alters the relationships between exercise-mediated sympathetic neural activity and melatonin secretion.

In humans at rest, melatonin administration decreased heart rate and blood pressure suggesting that melatonin increases cardiac vagal tone in the supine position in awake men. Melatonin administration also may exert suppressive effects on sympathetic tone as evidenced by a decrease in catecholamine and dopamine levels [61]. This effect of melatonin could reinforce the exercise-induced rise in vagal resting tone, which improves exercise performance.

Acute myocardial infarction (AMI) is a pathological condition which is associated with marked neuroendocrine dysfunction in addition to cardiac damage. Clinical studies have reported an increased incidence of AMI, sudden death and ischemia when there is a rapid withdrawal of vagal activity and an increase in sympathetic tone [62]. This condition is related to a rise in proinflammatory agents and a decrease in the serum levels of anti-inflammatory and antioxidant compounds including melatonin [63].

Physical exertion acts as a trigger of sudden death and AMI in susceptible individuals [63], and current evidence suggests that prolonged intense exercise causes the heart to become transiently dysfunctional, with a reduction in left systolic and diastolic function [64]. In a rat model, it has been reported that melatonin administration prior to acute exercise reduces elevated creatine kinase (CK) and cardio-specific isoenzyme of CK (CK-MB) activities in blood and myeloperoxidase levels in cardiac muscle. In addition, exercise was associated with a significant rise in TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 mRNA levels in heart, suggesting an inflammatory response that is also supported by the elevation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and a significant activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) [65]. These effects were totally or partially prevented by melatonin administration, which suggests that melatonin administration has potent protective effects against damage caused by acute exercise in rat heart. These findings are in keeping with the beneficial effects reported for melatonin on age-related oxidative stress and inflammation in mouse hearts [66]. It is therefore reasonable to conclude that melatonin supplementation would reduce the risk of AMI and myocardial damage associated with acute exercise. Indeed, in animal studies, it is well documented that melatonin reduces damage to heart muscle after ischemia/reperfusion injury [67].

### Effects on the skeletal muscle and motor end-plate

One important factor in physical performance is the adaptative capability of skeletal muscle to different types of exercise training which depends on rearrangements in the contractile apparatus, mitochondria, other fiber organelles and neuromuscular junctions. Endurance exercise, commonly performed at a moderate intensity with continuous or interval-based repetitions, results in increased mitochondrial number, capillary density, enhanced capacity of the oxidation of carbohydrates and lipids [68–70] and the structural–functional relationships between the energy system and contractile machinery in muscle fibers [71]. Resistance exercise, which is commonly performed at high intensities for shorter durations of time, enhances muscle size by increasing the synthesis of contractile and structural proteins and, as a result, the muscle is often larger and also more powerful [72].

There is not much information related to melatonin effects on nerve physiology and remodeling after exercise. Remodeling of the sciatic nerve because of heavy exercise caused an increase in rheobase and chronaxie, and a reduction in the maximum depolarization, total area under the compound action potential (CAP), fall-down phase of

CAP kinetics and speed of the intermediately conducting group. Pretreatment with melatonin protected the sciatic nerve from exercise-induced damage, which increased the contribution of intermediate nerve fibers to muscle excitation [73].

Nicotinic AChRs (nAChRs) are ligand-gated ion channels formed by pentameric arrangements of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, which based on their sensitivity to  $\alpha$ -BTX and nicotine can be subdivided in two large families [74]. Endurance training increases the abundance of endplate-associated nAChRs that are sensitive to  $\alpha$ -BTX [75]. Data collected in several tissues and under different conditions indicate that the nocturnal melatonin surge increases the number and/or potentiates the effects mediated by nAChRs sensitive to  $\alpha$ -BTX (reviewed in [76]). Thus, it is possible that endogenous or exogenous melatonin enhances the response of skeletal fibers to alpha motoneurons, increasing exercise performance. This hypothesis has not been tested to date.

### Effects on exercise-related metabolism

Carbohydrate, fat, and amino acid metabolic pathways provide a substrate for muscular energy metabolism [77]. During prolonged exercise, both glucose and free fatty acids are utilized as fuels [78], which results in a significant hypoglycemia and increased plasma levels of lactate and  $\beta$ -hydroxybutyrate, together with a significant reduction of glycogen in muscle and liver [79]. Skeletal and liver glycogen can provide much of the carbohydrate required to perform endurance activities. However, the longer the exercise duration, the larger is the contribution of liver glucose arising from glycogenolysis and gluconeogenesis as an energy substrate [80]. The ability to store and maintain muscle glycogen has long been considered to be the most important limiting factor in the successful performance of submaximal endurance events [78]. It has been shown that melatonin supplementation before exercise preserves glycogen stores through changes in carbohydrate and lipid utilization maintaining glycemia and reducing plasma and liver lactate and plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate [79, 81, 82]. Metabolic effects of melatonin in exercised rats are not related to a decrease in nitric oxide because blockade of nitric oxide synthase by L-NAME did not mimic those of melatonin. A role of GH, although suggested by the authors, is not supported by the effects of the cholinergic agonist pyridostigmine [81]. Melatonin also increases glucose uptake into skeletal muscle via the stimulation in phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and the activity of phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase) [83], which would help to increase myotube glucose content during exercise.

### Effects on muscle oxidative stress

It has been known since the late 1970s that exercise promotes oxidative stress [84] with skeletal muscle being one of the major source of free radicals and ROS generation [85]. The available evidence suggests that contracting muscles produce ROS from several cellular locations: mitochondria, NADPH oxidase (located in sarcoplasmic reticulum, transverse tubules, and sarcolemma), PLA2-

dependent processes and xanthine oxidase (reviewed in [86]). It is well established that low levels of ROS are a requirement for normal force production [87] and that a small increase in ROS in skeletal fibers promotes an elevation in force generation, whereas high ROS concentrations reduce force production [88] and contribute to muscular fatigue during prolonged and intense exercise [85]. Animals and human studies have shown that scavenging of ROS with the use of antioxidants delays muscle fatigue and melatonin, owing to its antioxidant activity, reduced free radical-mediated muscle damage resulting from exercise [89, 90]. The role of melatonin as an effective antioxidant agent and a free radical scavenger in all tissues is well known. This effect is initiated by oxidative cleavage of the pyrrole ring when it donates an electron [38, 39, 91, 92] and it is enhanced by its metabolites cyclic 3-hydroxymelatonin (C3-OHMel) and *N*1-acetyl-*N*2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and *N*1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) [93–96]. Taking this into account, it is highly probable that melatonin treatment can reduce muscle fatigue improving physical performance.

Repeated bouts of endurance exercise increases aerobic capacity and improves mitochondrial function of the skeletal muscle. Proteomic analysis of human skeletal muscle mitochondria after training has shown that proteins related to enhanced capacity for adenosine triphosphate generation were differentially expressed [97]. In addition, mitochondrial biogenesis is promoted via activation of the transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  [98], and free radicals were suggested as the possible signal for mitochondrial biogenesis [99]. However, it has also been reported that strenuous or excessive exercise causes fatigue and damage to muscle accompanied by a decrease in PGC-1 $\alpha$  and a rise in autophagy and mitochondrial fission in skeletal muscle. This was reverted after treatment with the antioxidant hydroxytyrosol, which also favored mitochondria fusion and elevated mitochondrial complex I and II activities [100]. Although melatonin effects on mitochondrial function have not yet been explored in exercise, the beneficial effects of melatonin in the restoration or preservation of mitochondrial function after ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle is well documented [101, 102]. Our group has also shown that melatonin counteracts sepsis-induced mtNOS induction and respiratory chain failure in the diaphragm and skeletal muscle by restoring the redox status [103, 104]. Mitochondria from iNOS knockout (iNOS<sup>-/-</sup>) mice were unaffected by either sepsis or melatonin treatment, indicating a role for NO in the deleterious effects of sepsis and that melatonin can protect against mtNOS-mediated mitochondrial failure. More extensive reviews on the effects of melatonin in mitochondrial function can be found elsewhere [105, 106].

### Effect on physical performance

Based on these findings, we would expect an increase in physical performance after melatonin usage. There is little research on this topic, and the results found are not promising. Some studies looked for the hypothermic effects of melatonin to improve endurance performance in hot environments and the results are not consistent. It has been reported that melatonin has no influence on rectal or skin

temperature responses at rest or during walking at 40°C when a dose of 1 mg melatonin was evaluated, but 5 mg caused a significant decrease in core temperature during rest and during walking in an environment at 23°C, but no effects were found when trials were performed at 40°C [107]. It was recently reported that 2.5 mg of melatonin moderated the increase of rectal temperature, and amplified the skin blood flow and hypotension responses to exercise without any side effects on alertness [108].

There are also some reports suggesting that when melatonin (10–80 mg) was administered in the daytime to men, their reaction time was slowed, subjective alertness decreased and the number of correct responses on a vigilance task dropped [109]. In a different study, 5 mg of melatonin did not increase performance and ratings of perceived exertion during a 4-km cycling time trial, but reduced alertness, short-term memory, eight-choice reaction time and intra-aural temperature [110]. Similarly, melatonin administration during daytime did not have any acute effects either on the maximal jumping ability or on strength in spite of the reported decrease in alertness by melatonin [111].

Regarding exercise performance, a study designed to determine whether melatonin could overcome the decline in the performance caused by jet-lag reported no effects on static nor dynamic physical performance, whereas caffeine slightly recovered static physical performance after jet lag [112]. Considering the reported findings, melatonin may have a greater effect on cognitive performance variables than on physical performance [34]. More detailed studies in animals and humans are needed to unveil the effects of melatonin on exercise performance.

### Conclusions and perspectives

From the data reviewed here, it is clear that the exercise–melatonin interplay may have a favorable influence over many systems in the body. More information on exercise and melatonin, however, is necessary to explain some contradictory findings in the literature. If the exercise–melatonin relationships are clarified, through a careful control of time of exercise and light experimental conditions, a melatonin phase response curve for exercise may be clarified. Moreover, additional research is required to fully understand the relationship between exercise and melatonin, because some of the effects of exercise on human biology may be mediated by melatonin. In this regard, melatonin reduces oxidative stress and inflammation in cardiac and skeletal muscle induced by different conditions such as sepsis, aging, exercise, etc. [104, 113–118]. Thus, the levels of melatonin detected after exercise do not correspond to the melatonin produced by exercise itself, but also depend on the degree of utilization of melatonin in resisting oxidative damage. Finally, the results of future studies may yield important information on the melatonin–exercise interactions, which are relevant in the clinical practice [119–121].

### Acknowledgements

This study was partially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (RD06/0013/0008,

RD06/0013/1012, and RD06/0013/0019, RETICEF); from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (BFU 2010-21945-CO1, and BFU 2007-60563), and from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, Spain (CTS-101).

## Author contributions

All authors have directly contributed to the preparation and drafting of the manuscript, its critical revision, and approval of the final form of this review.

## Conflict of interest

None to declare.

## References

1. WELSH DK, TAKAHASHI JS, KAY SA. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 2010; **72**:551–577.
2. DIBNER C, SCHIBLER U, ALBRECHT U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 2010; **72**:517–549.
3. GARAULET M, ORDOVAS JM, GOMEZ-ABELLAN P et al. An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism. *J Cell Physiol* 2011; **226**:2075–2080.
4. GOMEZ-SANTOS C, GOMEZ-ABELLAN P, MADRID JA et al. Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants. *Obesity (Silver Spring)* 2009; **17**:1481–1485.
5. BARNARD AR, NOLAN PM. When clocks go bad: neuro-behavioural consequences of disrupted circadian timing. *PLoS Genet* 2008; **4**:e1000040.
6. ERREN TC, REITER RJ. Defining chronodisruption. *J Pineal Res* 2009; **46**:245–247.
7. GARAULET M, MADRID JA. Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2009; **20**:127–134.
8. BAEHR EK, EASTMAN CI, REVELLE W et al. Circadian phase-shifting effects of nocturnal exercise in older compared with young adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **284**:R1542–R1550.
9. BUXTON OM, FRANK SA, L'HERMITE-BALERIAUX M et al. Roles of intensity and duration of nocturnal exercise in causing phase delays of human circadian rhythms. *Am J Physiol* 1997; **273**:E536–E542.
10. VAN REETH O, STURIS J, BYRNE MM et al. Nocturnal exercise phase delays circadian rhythms of melatonin and thyrotropin secretion in normal men. *Am J Physiol* 1994; **266**:E964–E974.
11. BARGER LK, WRIGHT KP JR, HUGHES RJ et al. Daily exercise facilitates phase delays of circadian melatonin rhythm in very dim light. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; **286**:R1077–R1084.
12. EASTMAN CI, HOESE EK, YOUNGSTEDT SD et al. Phase-shifting human circadian rhythms with exercise during the night shift. *Physiol Behav* 1995; **58**:1287–1291.
13. MIYAZAKI T, HASHIMOTO S, MASUBUCHI S et al. Phase-advance shifts of human circadian pacemaker are accelerated by daytime physical exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; **281**:R197–R205.
14. YAMANAKA Y, HASHIMOTO S, TANAHASHI Y et al. Physical exercise accelerates reentrainment of human sleep-wake cycle but not of plasma melatonin rhythm to 8-h phase-advanced sleep schedule. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; **298**:R681–R691.
15. LAX P, ZAMORA S, MADRID JA. Coupling effect of locomotor activity on the rat's circadian system. *Am J Physiol* 1998; **275**:R580–R587.
16. CHALLET E. Minireview: entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 2007; **148**:5648–5655.
17. OTALORA BB, VIVANCO P, MADARIAGA AM et al. Internal temporal order in the circadian system of a dual-phasing rodent, the Octodon degus. *Chronobiol Int* 2010; **27**:1564–1579.
18. VIVANCO P, ROL MA, MADRID JA. Two steady-entrainment phases and graded masking effects by light generate different circadian chronotypes in Octodon degus. *Chronobiol Int* 2009; **26**:219–241.
19. VAN SOMEREN EJ, LIJZENGA C, MIRMIRAN M et al. Long-term fitness training improves the circadian rest-activity rhythm in healthy elderly males. *J Biol Rhythms* 1997; **12**:146–156.
20. SHUB D, DARVISHI R, KUNIK ME. Non-pharmacologic treatment of insomnia in persons with dementia. *Geriatrics* 2009; **64**:22–26.
21. ATKINSON G, EDWARDS B, REILLY T et al. Exercise as a synchroniser of human circadian rhythms: an update and discussion of the methodological problems. *Eur J Appl Physiol* 2007; **99**:331–341.
22. ATKINSON G, COLDWELLS A, REILLY T et al. A comparison of circadian rhythms in work performance between physically active and inactive subjects. *Ergonomics* 1993; **36**:273–281.
23. LOCKLEY SW, ARENDT J, SKENE DJ. Visual impairment and circadian rhythm disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 2007; **9**:301–314.
24. THERON JJ, OOSTHUIZEN JM, RAUTENBACH MM. Effect of physical exercise on plasma melatonin levels in normal volunteers. *S Afr Med J* 1984; **66**:838–841.
25. CARR DB, REPPERT SM, BULLEN B et al. Plasma melatonin increases during exercise in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; **53**:224–225.
26. SKRINAR GS, BULLEN BA, REPPERT SM et al. Melatonin response to exercise training in women. *J Pineal Res* 1989; **7**:185–194.
27. MONTELEONE P, MAJ M, FUSCO M et al. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. *Life Sci* 1990; **47**:1989–1995.
28. MONTELEONE P, MAJ M, FUSCHINO A et al. Physical stress in the middle of the dark phase does not affect light-depressed plasma melatonin levels in humans. *Neuroendocrinology* 1992; **55**:367–371.
29. ELIAS AN, WILSON AF, PANDIAN MR et al. Melatonin and gonadotropin secretion after acute exercise in physically active males. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1993; **66**:357–361.
30. PAREDES SD, SANCHEZ S, RIA RV et al. Changes in behaviour and in the circadian rhythms of melatonin and corticosterone in rats subjected to a forced-swimming test. *J Appl Biomed* 2005; **3**:47–57.
31. WRIGHT HR, LACK LC. Effect of light wavelength on suppression and phase delay of the melatonin rhythm. *Chronobiol Int* 2001; **18**:801–808.
32. BUXTON OM, LEE CW, L'HERMITE-BALERIAUX M et al. Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that vary with circadian phase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **284**:R714–R724.

33. BUXTON OM, L'HERMITE-BALERIAUX M, HIRSCHFELD U et al. Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion. *J Biol Rhythms* 1997; **12**:568–574.
34. ATKINSON G, DRUST B, REILLY T et al. The relevance of melatonin to sports medicine and science. *Sports Med* 2003; **33**:809–831.
35. KNIGHT JA, THOMPSON S, RABOUD JM et al. Light and exercise and melatonin production in women. *Am J Epidemiol* 2005; **162**:1114–1122.
36. RONKAINEN H, VAKKURI O, KAUPPILA A. Effects of physical exercise on the serum concentration of melatonin in female runners. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1986; **65**:827–829.
37. EDWARDS BJ, REILLY T, WATERHOUSE J. Zeitgeber-effects of exercise on human circadian rhythms: what are alternative approaches to investigating the existence of a phase-response curve to exercise? *Biol Rhythm Res* 2009; **40**:53–69.
38. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**:57–60.
39. REITER RJ, PAREDES SD, MANCHESTER LC et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; **44**:175–200.
40. LUCIA A, DIAZ B, HOYOS J et al. Hormone levels of world class cyclists during the Tour of Spain stage race. *Br J Sports Med* 2001; **35**:424–430.
41. SERRANO E, VENEGAS C, ESCAMES G et al. Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition. *J Sports Sci* 2010; **28**:1047–1056.
42. HARDELAND R, TAN DX, REITER RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 2009; **47**:109–126.
43. DUNLAP KL, REYNOLDS AJ, TOSINI G et al. Seasonal and diurnal melatonin production in exercising sled dogs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; **147**:863–867.
44. MARRIN K, DRUST B, GREGSON W et al. Diurnal variation in the salivary melatonin responses to exercise: relation to exercise-mediated tachycardia. *Eur J Appl Physiol* 2011; **7**:90–97.
45. BULLEN BA, SKRINAR GS, MCARTHUR JW et al. Exercise effect upon plasma melatonin levels in women: possible physiological significance. *Can J Appl Sport Sci* 1982; **7**:90–97.
46. REITER RJ, TAN DX, FUENTES-BROTO L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010; **181**:127–151.
47. BROWNSTEIN M, AXELROD J. Pineal gland: 24-hour rhythm in norepinephrine turnover. *Science* 1974; **184**:163–165.
48. MCMURRAY RG, FORSYTHE WA, MAR MH et al. Exercise intensity-related responses of beta-endorphin and catecholamines. *Med Sci Sports Exerc* 1987; **19**:570–574.
49. FRASCHINI F, STANKOV B. High affinity melatonin receptors in the vertebrate brain: implications for the control of the endogenous oscillatory systems. *Chronobiologia* 1994; **21**:89–92.
50. REDLIN U, MROSOVSKY N. Exercise and human circadian rhythms: what we know and what we need to know. *Chronobiol Int* 1997; **14**:221–229.
51. SOLBERG LC, HORTON TH, TUREK FW. Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. *Am J Physiol* 1999; **276**:R152–R161.
52. STROHLE A. Physical activity, exercise, depression and anxiety disorders. *J Neural Transm* 2009; **116**:777–784.
53. DOYNE EJ, OSSIP-KLEIN DJ, BOWMAN ED et al. Running versus weight lifting in the treatment of depression. *J Consult Clin Psychol* 1987; **55**:748–754.
54. OSSIP-KLEIN DJ, DOYNE EJ, BOWMAN ED et al. Effects of running or weight lifting on self-concept in clinically depressed women. *J Consult Clin Psychol* 1989; **57**:158–161.
55. CUESTA M, MENDOZA J, CLESSE D et al. Serotonergic activation potentiates light resetting of the main circadian clock and alters clock gene expression in a diurnal rodent. *Exp Neurol* 2008; **210**:501–513.
56. EHSANI AA, HAGBERG JM, HICKSON RC. Rapid changes in left ventricular dimensions and mass in response to physical conditioning and deconditioning. *Am J Cardiol* 1978; **42**:52–56.
57. MACIEL BC, GALLO JL, MARIN NETO JA et al. Autonomic nervous control of the heart rate during isometric exercise in normal man. *Pflugers Arch* 1987; **408**:173–177.
58. OGOH S, FISHER JP, DAWSON EA et al. Autonomic nervous system influence on arterial baroreflex control of heart rate during exercise in humans. *J Physiol* 2005; **566**:599–611.
59. COOTE JH. Recovery of heart rate following intense dynamic exercise. *Exp Physiol* 2010; **95**:431–440.
60. BOSMAN H, DORMEHL IC, HUGO N et al. The effect of intravenous administration of melatonin on cardiovascular parameters of the baboon (*Papio ursinus*). *J Pineal Res* 1991; **11**:179–181.
61. NISHIYAMA K, YASUE H, MORIYAMA Y et al. Acute effects of melatonin administration on cardiovascular autonomic regulation in healthy men. *Am Heart J* 2001; **141**:E1–E5.
62. VANOLI E, CERATI D, PEDRETTI RF. Autonomic control of heart rate: pharmacological and nonpharmacological modulation. *Basic Res Cardiol* 1998; **93**(Suppl 1):133–142.
63. SINGH RB, PELLA D, NEKI NS et al. Mechanisms of acute myocardial infarction study (MAMIS). *Biomed Pharmacother* 2004; **58**(Suppl 1):S111–S115.
64. DAWSON E, GEORGE K, SHAVE R et al. Does the human heart fatigue subsequent to prolonged exercise? *Sports Med* 2003; **33**:365–380.
65. VENEROSO C, TUNON MJ, GONZALEZ-GALLEGO J et al. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res* 2009; **47**:184–191.
66. FORMAN K, VARA E, GARCIA C et al. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. *J Pineal Res* 2010; **49**:312–320.
67. TENGATTINI S, REITER RJ, TAN DX et al. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 2008; **44**:16–25.
68. FLUCK M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol* 2006; **209**:2239–2248.
69. JOSEPH AM, PILEGAARD H, LITVINTSEV A et al. Control of gene expression and mitochondrial biogenesis in the muscular adaptation to endurance exercise. *Essays Biochem* 2006; **42**:13–29.
70. COFFEY VG, HAWLEY JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med* 2007; **37**:737–763.
71. SEENE T, KAASIK P, UMNova M. Structural rearrangements in contractile apparatus and resulting skeletal muscle remodeling: effect of exercise training. *J Sports Med Phys Fitness* 2009; **49**:410–423.
72. FRY AC. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports Med* 2004; **34**:663–679.
73. AYAZ M, OKUDAN N. Effects of melatonin supplementation on exercise-induced changes in conduction velocity distributions. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2009; **31**:151–156.

74. GOTTI C, CLEMENTI F, FORNARI A et al. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 2009; **78**:703–711.
75. DESAULNIERS P, LAVOIE PA, GARDINER PF. Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle. *Neuroreport* 1998; **9**:3549–3552.
76. MARKUS RP, SILVA CL, FRANCO DG et al. Is modulation of nicotinic acetylcholine receptors by melatonin relevant for therapy with cholinergic drugs? *Pharmacol Ther* 2010; **126**:251–262.
77. WASSERMAN DH, CHERRINGTON AD. Hepatic fuel metabolism during muscular work: role and regulation. *Am J Physiol* 1991; **260**:E811–E824.
78. HAGERMAN FC. Energy metabolism and fuel utilization. *Med Sci Sports Exerc* 1992; **24**:S309–S314.
79. MAZEPA RC, CUEVAS MJ, COLLADO PS et al. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci* 2000; **66**:153–160.
80. DOHM GL, NEWSHOLME EA. Metabolic control of hepatic gluconeogenesis during exercise. *Biochem J* 1983; **212**:633–639.
81. SANCHEZ-CAMPOS S, AREVALO M, MESONERO MJ et al. Effects of melatonin on fuel utilization in exercised rats: role of nitric oxide and growth hormone. *J Pineal Res* 2001; **31**:159–166.
82. KAYA O, GOKDEMIR K, KILIC M et al. Melatonin supplementation to rats subjected to acute swimming exercise: its effect on plasma lactate levels and relation with zinc. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; **27**:263–266.
83. HA E, YIM SV, CHUNG JH et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J Pineal Res* 2006; **41**:67–72.
84. DILLARD CJ, LITOV RE, SAVIN WM et al. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978; **45**:927–932.
85. POWERS SK, JACKSON MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008; **88**:1243–1276.
86. POWERS SK, NELSON WB, HUDSON MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med* 2011; doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.009.
87. REID MB. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; **90**:724–731.
88. REID MB, KHAWLI FA, MOODY MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol* 1993; **75**:1081–1087.
89. HARA M, ABE M, SUZUKI T et al. Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. *Pharmacol Toxicol* 1996; **78**:308–312.
90. HARA M, IIGO M, OHTANI-KANEKO R et al. Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol Signals* 1997; **6**:90–100.
91. REITER RJ. Melatonin: lowering the high price of free radicals. *News Physiol Sci* 2000; **15**:246–250.
92. PARADIES G, PETROSILLO G, PARADIES V et al. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res* 2010; **48**:297–310.
93. TAN DX, MANCHESTER LC, BURKHARDT S et al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001; **15**:2294–2296.
94. RESSMEYER AR, MAYO JC, ZELOSKO V et al. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep* 2003; **8**:205–213.
95. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; **42**:28–42.
96. CARAMPIN P, ROSAN S, DALZOPPO D et al. Some biochemical properties of melatonin and the characterization of a relevant metabolite arising from its interaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Pineal Res* 2003; **34**:134–142.
97. EGAN B, DOWLING P, O'CONNOR PL et al. 2-D DIGE analysis of the mitochondrial proteome from human skeletal muscle reveals time course-dependent remodelling in response to 14 consecutive days of endurance exercise training. *Proteomics* 2011; **11**:1413–1428.
98. SAFDAR A, LITTLE JP, STOKL AJ et al. Exercise increases mitochondrial PGC-1{alpha} content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 2011; **286**:10605–10617.
99. DAVIES KJ, QUINTANILHA AT, BROOKS GA et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **107**:1198–1205.
100. FENG Z, BAI L, YAN J et al. Mitochondrial dynamic remodeling in strenuous exercise-induced muscle and mitochondrial dysfunction: regulatory effects of hydroxytyrosol. *Free Radic Biol Med* 2011; **50**:1437–1446.
101. WANG WZ, FANG XH, STEPHENSON LL et al. Melatonin reduces ischemia/reperfusion-induced superoxide generation in arterial wall and cell death in skeletal muscle. *J Pineal Res* 2006; **41**:255–260.
102. WANG WZ, FANG XH, STEPHENSON LL et al. Melatonin attenuates I/R-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *J Surg Res* 2010; doi:10.1016/j.jss.2010.01.019.
103. LÓPEZ LC, ESCAMES G, ORTIZ F et al. Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; **27**:623–630.
104. ESCAMES G, LOPEZ LC, TAPIAS V et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006; **40**:71–78.
105. ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, RODRIGUEZ MI et al. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 2007; **12**:947–963.
106. ACUÑA-CASTROVIEJO D, LÓPEZ LC, ESCAMES G et al. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 2011; **11**:221–240.
107. MCLELLAN TM, GANNON GA, ZAMECNIK J et al. Low doses of melatonin and diurnal effects on thermoregulation and tolerance to uncompensable heat stress. *J Appl Physiol* 1999; **87**:308–316.
108. ATKINSON G, HOLDER A, ROBERTSON C et al. Effects of melatonin on the thermoregulatory responses to intermittent exercise. *J Pineal Res* 2005; **39**:353–359.
109. DOLLINS AB, LYNCH HJ, WURTMAN RJ et al. Effect of pharmacological daytime doses of melatonin on human mood and performance. *Psychopharmacology (Berl)* 1993; **112**:490–496.

110. ATKINSON G, JONES H, EDWARDS BJ et al. Effects of daytime ingestion of melatonin on short-term athletic performance. *Ergonomics* 2005; **48**:1512–1522.
111. MERO AA, VAHALUMMUKKA M, HULMI JJ et al. Effects of resistance exercise session after oral ingestion of melatonin on physiological and performance responses of adult men. *Eur J Appl Physiol* 2006; **96**:729–739.
112. LAGARDE D, CHAPPUIS B, BILLAUD PF et al. Evaluation of pharmacological aids on physical performance after a trans-meridian flight. *Med Sci Sports Exerc* 2001; **33**:628–634.
113. KIM CH, KIM KH, YOO YM. Melatonin protects against apoptotic and autophagic cell death in C2C12 murine myoblast cells. *J Pineal Res* 2011; **50**:241–249.
114. OCHOA JJ, DÍAZ-CASTRO J, KAJARABILLE N et al. Melatonin supplementation ameliorates oxidative stress and inflammatory signaling induced by strenuous exercise in adult human males. *J Pineal Res* 2011; doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00899.x.
115. ESCAMES G, LÓPEZ LC, ORTIZ F et al. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 2007; **274**:2135–2147.
116. RODRÍGUEZ MI, CARRETERO M, ESCAMES G et al. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res* 2007; **41**:15–24.
117. RODRÍGUEZ MI, ESCAMES G, LÓPEZ LC et al. Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence accelerated mice. *J Endocrinol* 2007; **194**:637–643.
118. MUKHERJEE D, ROY SG, BANDYOPADHYAY A et al. Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms. *J Pineal Res* 2010; **48**:251–262.
119. HONG Y, PALAKSHA KJ, PARK K et al. Melatonin plus exercise-based neurorehabilitative therapy for spinal cord injury. *J Pineal Res* 2010; **49**:201–209.
120. CHAHBOUNI M, ESCAMES G, VENEGAS C et al. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res* 2010; **48**:282–289.
121. CHAHBOUNI M, ESCAMES G, LÓPEZ LC et al. Melatonin treatment counteracts the hyperoxidative status in erythrocytes of patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Clin Biochem* 2011; **44**:853–858.