

TESIS

DOCTORAL



**Yahira Barranco Ruiz**  
**Tesis Doctoral - 2012**

**MARCADORES SANGUÍNEOS DE ENVEJECIMIENTO  
POR ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR  
LA PRÁCTICA DEPORTIVA: DIFERENCIAS ENTRE  
DEPORTISTAS RECREACIONALES Y DE ÉLITE**

**Yahira Barranco Ruiz**  
**UNIVERSIDAD DE GRANADA, 2012**

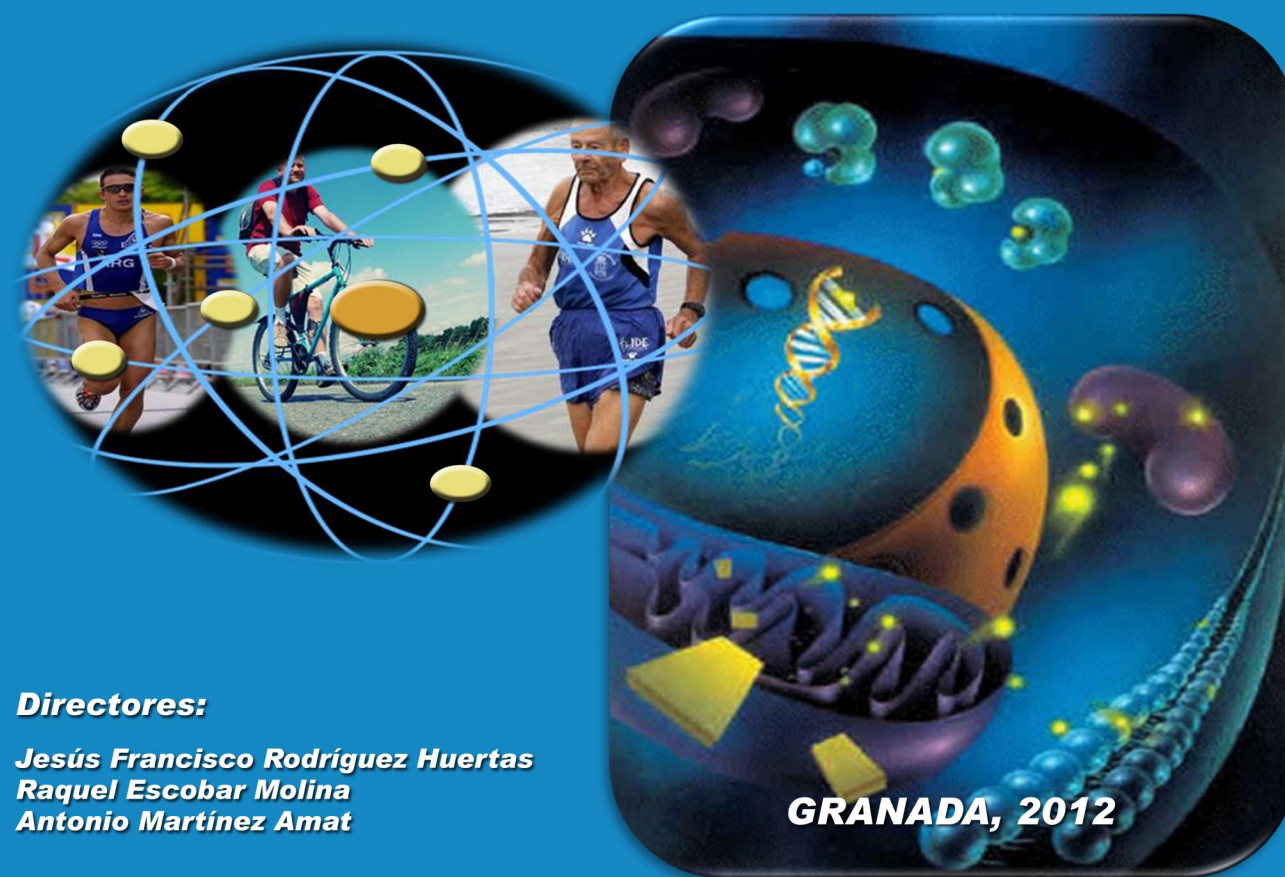


**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL DEPORTE**

**Departamento de Fisiología**  
**Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos**  
**Centro de Investigación Biomédica**

**MARCADORES SANGUÍNEOS DE ENVEJECIMIENTO  
POR ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR  
LA PRÁCTICA DEPORTIVA: DIFERENCIAS ENTRE  
DEPORTISTAS RECREACIONALES Y DE ÉLITE**

**Yahira Barranco Ruiz**



**Directores:**

**Jesús Francisco Rodríguez Huertas**  
**Raquel Escobar Molina**  
**Antonio Martínez Amat**

**GRANADA, 2012**



Departamento de Fisiología

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

Centro de Investigaciones Biomédicas

Universidad de Granada

***Marcadores sanguíneos de envejecimiento por estrés oxidativo inducido por la práctica deportiva: diferencias entre deportistas recreacionales y de élite***

**Yahira Barranco Ruiz**

**Granada, 2012**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Yahira Barranco Ruiz  
D.L.: GR 1704-2013  
ISBN: 978-84-9028-581-7



# **Marcadores sanguíneos de envejecimiento por estrés oxidativo inducido por la práctica deportiva: diferencias entre deportistas recreacionales y de élite**

Memoria que presenta la Lda. Yahira Barranco Ruiz para aspirar al Grado de Doctora en Actividad Física y Salud

Dña. Yahira Barranco Ruiz

Aspirante al grado de

Doctora en Actividad Física y Salud

Esta tesis doctoral ha sido realizada bajo las direcciones de:

Dr. D. Jesús Francisco  
Rodríguez Huertas

Dra. Dña. Raquel  
Escobar Molina

Dr. D. Antonio  
Martínez Amat



**D. Jesús Rodríguez Huertas, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Granada.**

**Dña. Raquel Escobar Molina, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Educación Física y Deportiva de la Universidad de Granada.**

**D. Antonio Martínez Amat, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.**

**Certifican que Dña. Yahira Barranco Ruiz, Licenciada en Educación Física, ha realizado bajo nuestra dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: “Marcadores sanguíneos de envejecimiento por estrés oxidativo inducido por la práctica deportiva: diferencias entre deportistas recreacionales y de élite.” que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.**

**Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada, a 11 de Septiembre de 2012.**

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

**Dra. Dña. Raquel  
Escobar Molina**

**Dr. D. Antonio  
Martínez Amat**





Este estudio forma parte de sendos Proyectos de Investigación concedidos en convocatoria pública de Ayudas a Universidades y a Entidades Públicas para Proyectos de Apoyo Científico y Tecnológico al Deporte y otras acciones de promoción y difusión de la investigación deportiva para el año 2007 y 2010 (Referencias: 26/UPB20/O7 y 33/UPB10/10). Parte del estudio se ha realizado con fondos de las ayudas al Grupo de Investigación CTS454 de la Junta de Andalucía.

**Parte de los resultados han sido utilizados y/o publicados en:**

- **Memoria del Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A.),** por la Licenciada Yahira Barranco Ruiz correspondiente al DEA del Programa de Doctorado “Actividad Física y Salud” de la Universidad de Granada, obteniendo la máxima calificación de Sobresaliente. Directores: Dr. Rafael Guisado y Dr. Jesús Francisco Rodríguez Huertas. Fecha: Septiembre de 2009.
- **Comunicación oral al Congreso: XXX FIMS WORLD CONGRESS OF SPORTS MEDICINE (INTERNACIONAL). Comunicación al XIII Congreso Nacional de la Federación Española de Medicina del Deporte (FEMEDE).** Autores: Barranco-Ruiz Y, De la Plata J, Gallo MA, Gutiérrez-Ríos P, Ibáñez S y Huertas JR. Título “Lymphocyte DNA Damage Before and After a Submaximal Exercise: Well-Trained Against Recreational Cyclists”. Publicado en: Archivos de Medicina Deportiva. Volumen XXV (6). Barcelona, España. 18-23 de noviembre de 2008.
- **Comunicación oral al Congreso: XVII Congreso Nacional de la Federación Española de Medicina del Deporte (FEMEDE).** Autores: Barranco-Ruiz Y; Gómez SN; Rosillo S; Rivas-García A, Martínez-Amat A, Escobar R, De Teresa C y Huertas JR. Título “Evolución con la edad del estrés oxidativo en deportistas de élite frente a recreacionales”. Publicado en: Archivos de Medicina Deportiva. ISSN 0212-8799 (Vol: XXVII; pág.: 361-362). Bilbao, España. 28-30 de octubre de 2010.
- **Comunicación oral al Congreso: Congreso Internacional de la Asociación Española de Ciencias del Deporte.** Autores: Barranco-Ruiz Y, Aragón-Vela J, Casals C, Rosillo S, Amat A, Huertas JR. “westernblot de  $\alpha$ -actina en suero como marcador de daño sarcomérico en pruebas de esfuerzos submáximas”.
- **Comunicación oral al Congreso: Congreso Internacional de la Asociación Española de Ciencias del Deporte.** Autores: Casals, C, Escobar-Molina, R, Rosillo, S, Barranco-Ruiz, Y, Carratalá, V, Huertas, JR. Lower Lipid Peroxidation In Elite Females Judokas Compared With Males After A Specific Test.
- **Comunicación oral al Congreso: Congreso Internacional de la Asociación Española de Ciencias del Deporte.** Casals, C, Escobar-Molina, R, Rosillo, S, Barranco-Ruiz, Y, Carratalá, V, Huertas, JR. Ideal Anthropometrical Profile Of Elite Judokas Based On Number Of Throws During The Sterkowicz Test.
- **Comunicación oral al Congreso: XIV Congreso Nacional De La Federación Española De Medicina Del Deporte.** Autores: Casals C, Escobar-Molina R, Barranco-Ruiz Y, Rosillo S, Carratalá V, Huertas JR. “Medidas antropométricas en judocas españoles de élite y su relación con el special judo fitness test”. Publicado:
- **Comunicación oral al Congreso: XIV Congreso Nacional De La Federación Española De Medicina Del Deporte.** Autores: “ $\alpha$ -actina en suero como marcador de daño sarcomérico en pruebas de esfuerzos submáximas”. Barranco-Ruiz Y, Aragón-Vela J; Casals C, Rosillo S, Amat A, De Teresa C y Huertas JR.



*Dedicado a mis padres, mi familia y mis amigos, los cuales día a día, y  
cual sea mi camino, siempre se suben a mi tren....*

*“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños”*

*Paulo Coelho*



## AGRADECIMIENTOS

*Me gustaría agradecer su colaboración a todas aquellas personas que formaron parte de este estudio como sujetos experimentales, que de forma altruista dedicaron su tiempo y esfuerzo, y que sin ellos no hubiese sido posible desarrollar esta investigación. A todos los responsables de las instalaciones de la Facultad de Ciencias del Deporte (mi facultad). Gracias por su ayuda y cooperación.*

*Gracias también a todos mis compañeros del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, destacando la dedicación de aquéllos que compartieron duros momentos en el laboratorio; sin su ayuda y paciencia mi camino en el mundo de la investigación hubiese sido de eternas horas frente a las probetas, centrifugas, microscopios y demás implementos del laboratorio del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada. Gracias a: Puri: me mostró el rigor científico; Silvia: amiga absoluta en las batallas de laboratorio de la cual he aprendido a “espabilar” entre llantos y risas, gracias por ayudarme y apoyarme tanto; Cristina: siempre metódica y calma; Jerónimo: felicidad y buen humor.*

*Y por supuesto, no me podría olvidar de aquéllos que pasaron trayendo su alegría y cultura a nuestro equipo: Tizziana, de la que aprendí a ser meticulosa en el trabajo, Silvia, siempre recordaré su sonrisa y cariño incondicional ante cualquier problema y Silvana, gran amiga en la recta final y mi inspiración para finalizar esta gran carrera de fondo. Sin ti, hubiese perdido la fe, gracias eternamente por transmitirme tus valores y estar ahí siempre.*

*Agradecimientos a mis seres queridos: mis padres, porque me lo han dado todo con mucho esfuerzo, cariño y un apoyo incondicional inculcándome valores de los cuales estoy muy orgullosa, todo lo que soy*

*se lo debo a ellos; a todos mis familiares y en especial a mi abuelo Manolo, que siempre me ha enseñado a terminar aquello que empiezas con aquella frase de “que seas formalita eh preciosa”, ha ansiado este momento tanto como yo y espero que disfrute de ello.*

*A mis amigos, los cuales han sido y son la palabra autoestima cada día que he dedicado a este trabajo, en especial, mis dos “perlas” halladas en la Facultad del Deporte y las cuales mimaré y guardaré siempre con mucho cariño Mariel y Raquel. A mi novio, Emilio; Tú me has enseñado a valorarme y confiar en mi, a caerme y a levantarme con más fuerza; Gracias por llenarme de cariño, detalles y tranquilidad en el final de un principio, sin ti no lo hubiese logrado.*

*A mis codirectores: Raquel Escobar Molina: de la cual admiro su personalidad inigualable, su rigor, cercanía y superación. Antonio Martínez Amat, siempre atento y compartiendo sus grandes conocimientos de ciencia y salud.*

*Y por supuesto, dar las gracias, al culpable de introducirme en el maravilloso mundo de la investigación, mi admirado director de tesis, Jesús Rodríguez Huertas, por su tiempo, entereza, dedicación y cercanía, sin los cuales no hubiese sido posible este trabajo.*

*Gracias*

## ABREVIATURAS:

<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>MAD:</b> malondialdehído
<b>ADNmt:</b> ácido desoxirribonucleico mitocondrial	<b>NaCl:</b> cloruro sódico
<b>ARNmt:</b> ácido ribonucleico mitocondrial	<b>NADH:</b> nicotinamida adenina dinucleótido
<b>ATP:</b> adenosín trifosfato	<b>NAOH:</b> hidróxido de sodio
<b>CAT:</b> catalasa	<b>NO:</b> óxido nítrico
<b>CoQ:</b> coenzima Q	<b>O<sub>2</sub>:</b> oxígeno
<b>COX:</b> citocromo oxidado	<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup>:</b> radical superóxido
<b>CTE:</b> cadena de transporte de electrones	<b>OH<sup>-</sup>:</b> radical hidróxilo
<b>DAPI:</b> 4',6-diamidino-2-phenylindole	<b>OMS:</b> organización mundial de la salud
<b>DMSO:</b> dimethyl sulfoxide	<b>OXPHOS:</b> fosforilación oxidativa
<b>ERON:</b> especies reactivas del oxígeno y nitrógeno	<b>PAD:</b> presión arterial diastólica
<b>EROs:</b> especies reactivas del oxígeno	<b>PAS:</b> presión arterial sistólica
<b>FBS:</b> suero bovino fetal.	<b>PBS:</b> tampón fosfato salino
<b>FC:</b> frecuencia cardiaca	<b>Pi:</b> fósforo
<b>Fe:</b> hierro	<b>PUFAs:</b> ácidos grasos polinsaturados
<b>Hpx:</b> hidroperóxidos	<b>RPM:</b> revoluciones por minuto
<b>GPx:</b> glutatión peroxidasa	<b>S:</b> azufre
<b>GR:</b> glutatión reductasa	<b>SBF:</b> suero bovino fetal
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> hidroperóxidos	<b>SOD:</b> superóxido dismutasa
<b>Hc:</b> hematocrito	<b>TEM:</b> error técnico de medición
<b>HCl 37%:</b> ácido clorhídrico	<b>TBARS:</b> sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
<b>HMP:</b> high melting point	<b>TCA:</b> ácido tricarbóxico
<b>HO<sub>2</sub><sup>·</sup>:</b> radical hidroperóxido	<b>VO<sub>2</sub>max:</b> consumo máximo del oxígeno
<b>IMC:</b> índice de masa corporal	<b>X:</b> xantina
<b>LMP:</b> low melting point	<b>XO:</b> xantina oxidasa





# INDICE

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Justificación.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Objetivos de la investigación.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Objetivo General.....	7
1.2.2. Objetivos Específicos.....	7
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>9</b>
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Importancia del oxígeno en la vida.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Concepto y principios del envejecimiento.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Teoría de los radicales libres.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. Estrés Oxidativo: Especies Reactivas Del Oxígeno.....</b>	<b>16</b>
2.4.1. Anión Superóxido ( $O_2^-$ ).....	17
2.4.2. Peróxido De Hidrógeno ( $H_2O_2$ ).....	18
2.4.3. Radical Hidroxilo ( $OH^\cdot$ ).....	19
2.4.4. Oxígeno Singlete ( $^1O_2$ ).....	19
2.4.5. Especies reactivas del nitrógeno.....	20
2.4.6. Especies Reactivas del Sulfuro.....	20
2.4.7. Especies reactivas secundarias.....	20
<b>2.5. Estrés Oxidativo A Nivel Molecular.....</b>	<b>22</b>
2.5.1. Posibles Mecanismos Productores De Estrés Oxidativo.....	22
2.5.2. Daños producidos por el estrés oxidativo: peroxidación lipídica, oxidación de proteínas carbohidratos y ADN.....	32
2.5.3. Daño de origen muscular.....	38
<b>2.6. Sistema de defensa antioxidante.....</b>	<b>42</b>
2.6.1. Antioxidantes enzimáticos.....	49
2.6.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	55
<b>2.7. Función de radical libre en la fatiga muscular.....</b>	<b>67</b>
<b>2.8. Importancia de la actividad física frente a un estilo de vida sedentario.....</b>	<b>71</b>
<b>2.9. Importancia de la actividad física como herramienta anti envejecimiento.....</b>	<b>73</b>
<b>2.10. Estrés oxidativo y tipo de práctica deportiva.....</b>	<b>76</b>
2.10.1. Práctica deportiva con predominio aeróbico.....	77

2.10.2.	Práctica deportiva con predominio anaeróbico .....	81
2.10.3.	Práctica deportiva mixta.....	83
<b>2.11.</b>	<b>Efectos del entrenamiento sobre el estrés oxidativo .....</b>	<b>84</b>
2.11.1.	Efectos según tipo de entrenamiento.....	84
2.11.2.	Relación entre la carga de entrenamiento y el estrés oxidativo .....	88
2.11.3.	Relación entre estrés oxidativo y sobreentrenamiento .....	89
<b>CAPÍTULO III.</b>		
<b>MATERIAL Y MÉTODO.....</b>		<b>93</b>
<b>3.1.</b>	<b>Metodología y plan de trabajo .....</b>	<b>95</b>
3.1.1.	Sujetos experimentales .....	95
3.1.2.	Criterios de selección.....	96
3.1.3.	Tipo de estudio y variables descritas .....	97
3.1.4.	Instalaciones utilizadas para la investigación.....	98
3.1.5.	Procedimiento de la investigación.....	98
<b>3.2.</b>	<b>Material y métodos utilizados. ....</b>	<b>99</b>
3.2.1.	Análisis corporal. Valoración antropométrica.....	99
3.2.2.	Valoración del esfuerzo. Test submáximo incremental.....	102
3.2.3.	Aislamiento de linfocitos. Centrifugación por gradiente .....	104
3.2.4.	Determinación del daño oxidativo en el ADN de los ..... infocitos periféricos: Comet Assay Technique .....	105
3.2.5.	Determinación de marcadores de peroxidación lipídica: TBAR's e hidroperóxidos .....	109
3.2.6.	Antioxidantes Enzimáticos. ....	112
3.2.7.	Antioxidantes no enzimáticos. Extracción y determinación de ..... ubiquinona, betacaroteno, retinol y vitamina E por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). ....	119
3.2.8.	Marcadores de daño sarcomérico .....	121
<b>3.3.</b>	<b>Tratamiento Estadístico.....</b>	<b>126</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>		
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>131</b>
<b>4.1.</b>	<b>Parámetros de selección de sujetos y de evaluación corporal.....</b>	<b>133</b>
4.1.1.	Criterios de selección de los sujetos experimentales .....	133
4.1.2.	Características antropométricas .....	133
4.1.3.	Parámetros bioquímicos relacionados con la actividad física y la salud .....	138
<b>4.2.</b>	<b>Parámetros de la prueba de esfuerzo .....</b>	<b>139</b>

<b>4.3. Marcadores de daño sarcomérico. Cuantificación de la proteína <math>\alpha</math>-actina .....</b>	<b>144</b>
<b>4.4. Marcadores de envejecimiento por estrés oxidativo .....</b>	<b>148</b>
4.4.1. Daño en el ADN de linfocitos periféricos .....	148
4.4.2. Marcadores plasmáticos de peroxidación lipídica.....	149
4.4.3. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes citosólicas	150
4.4.4. Cuantificación de antioxidantes en plasma .....	154

## **CAPITULO V**

<b>DICUSIÓN .....</b>	<b>157</b>
<b>5.1. Beneficios de la práctica deportiva para la salud y en el proceso de envejecimiento .....</b>	<b>159</b>
<b>5.2. Características antropométricas de los sujetos .....</b>	<b>161</b>
<b>5.3. Parámetros bioquímicos-clínicos relacionados con la actividad física y la salud .....</b>	<b>163</b>
<b>5.4. Parámetros del test de esfuerzo .....</b>	<b>164</b>
5.4.1. Parámetros ergométricos .....	164
5.4.2. Parámetros fisiológicos .....	165
5.4.3. Parámetros de daño sarcomérico .....	167
5.4.4. Parámetros de estrés oxidativo .....	171
5.4.5. Respuesta antioxidante .....	178

## **CAPÍTULO VI**

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>185</b>
---------------------------	------------

## **CAPÍTULO VII**

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>189</b>
--------------------------	------------



## Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Representación esquemática de una mitocondria funcional. Tomado de Stryer (1995).	23
Ilustración 2. Resumen de los principales procesos que ocurren durante la respiración aerobia en una mitocondria. Tomado de Karp y col; (1996).	23
Ilustración 3. Cadena de transporte de electrones mitocondrial.	25
Ilustración 4. Posible localización de formación de EROs mitocondrial dentro de la CTE. Tomado de Finaud y cols, (2006).	26
Ilustración 5. Generación de Radicales Libres en el proceso de fagocitosis. Tomado de (Welbourn et al., 1991).	27
Ilustración 6. Metabolismo del ácido araquidónico y desarrollo de un proceso de peroxidación lipídica con subproducto MDA. Tomado de Powers y Jackson, (2008).	28
Ilustración 7. Fisiología del daño por isquemia reperusión. Tomado de (Welbourn, et al., 1991).	29
Ilustración 8. Catabolismo de las purinas produciendo una oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico. Generación de Radical Superóxido e inhibición por parte del isómero Alopurinol. Tomado de (Gomez-Cabrera, Domenech, & Vina, 2008).	31
Ilustración 9. Esquema de las fases de la peroxidación lipídica. Tomado de Céspedes, E; y Castillo, J (2008).	33
Ilustración 10. Productos finales de la agresión al ADN por EROS. Tomado de Casado, A y col; (2006).	38
Ilustración 11. Las fuentes potenciales de EROS en el músculo y la localización de las defensas antioxidantes (Finaud, et al., 2006).	48
Ilustración 12. Localización específica de la acción de cada antioxidante (enzimático y no enzimático). Tomada de (Powers & Jackson, 2008).	49
Ilustración 13. Ciclo de actuación de la GPx.	53
Ilustración 14. Intervención de la enzima GR en el ciclo del glutation y la actividad de la enzima GPx.	54
Ilustración 15. Acción de los antioxidantes en los radicales libres. SOD-Superóxido Dismutasa; GR- Glutation Reductasa; GSH y GSSG- Formas reducidas y oxidada del glutation; CAT- Catalasa; ADN-Ácido desoxirribonucleico; ARN- Ácido Ribonucleico. Tomada de Ferreira y col., (2007).	55
Ilustración 16. Distribución celular del GSH. Tomado de Mari y col., (2009).	57
Ilustración 17. Diferentes hipótesis sobre el rol de las EROs sobre la fatiga muscular Tomado de Finaud y col., (2006).	67
Ilustración 18. Modelo bifásico del efecto de las EROs en la producción de fuerza muscular propuesto por (Reid, 2008).	69
Ilustración 19. Esquema de análisis de marcadores sanguíneos relacionados con el estrés oxidativo de la investigación.	99
Ilustración 20. Imagen ADN linfocitario tintado, núcleo y ADN desfragmentado (Cola).	106
Ilustración 21. Diferentes niveles de estrés en el ADN linfocitario estudiado por Comet Assay.	106

Ilustración 22. Esquema general de las reacciones de los principales antioxidantes enzimáticos. ....	112
Ilustración 23. Actuación de la enzima SOD dismutación del oxígeno singlete. Tomado de: Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia, AMC, vol 50 (4), octubre-diciembre 2008. .	113
Ilustración 24. Sistema Xantina - Xantina Oxidasa. ....	114
Ilustración 25. Esquema de la reacción fisiológica GR-GPx.....	116
Ilustración 26. Esquema de la reacción fisiológica de la enzima GPx. ....	118
Ilustración 27. Cromatograma de Coenzima Q <sub>10</sub> .....	120
Ilustración 28. Concentración en % de Actina en diferentes concentraciones.....	125
Ilustración 29. Recta de concentración de actina. ....	125
Ilustración 30. Ejemplo significación estadística en diagrama de barras. ....	128
Ilustración 31. Somatocarta de los somatotipos individuales del grupo de sujetos Sedentarios.....	135
Ilustración 32. Somatocarta de los somatotipos individuales del grupo de sujetos Recreacionales. ....	135
Ilustración 33. Somatocarta de los somatotipos individuales del grupo de sujetos Élite.....	136
Ilustración 34. Somatocarta con los somatotipos medios de todos los grupos del estudio, incluido la SDD de cada uno de ellos. ....	136
Ilustración 35. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de la potencia máxima alcanzada (vatios) en la prueba de esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo .....	139
Ilustración 36. . Los resultados representan la media $\pm$ EEM de trabajo mecánico realizado en el test incremental submáximo medido en Kilojulios, por los sujetos de los distintos grupos experimentales. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. ....	140
Ilustración 37. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de la diferencia entre la frecuencia cardiaca post esfuerzo y al primer minuto de recuperación, alcanzada por los sujetos de los distintos grupos experimentales. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. ....	140
Ilustración 38. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de Presión Arterial Sistólica (mmHg) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. .	141
Ilustración 39. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de la Presión Arterial Diastólica (mmHg) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. ....	142
Ilustración 40. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de concentración de Lactato (mmol/l), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. .	143

Ilustración 41. Los resultados representan la media $\pm$ EEM del Hematocrito (%) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo.....	143
Ilustración 42. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de la concentración en suero de la proteína $\alpha$ - actina de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. ....	144
Ilustración 43. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de la Concentración en suero de la proteína Troponina I (cTnI) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. ....	145
Ilustración 44. Regresiones entre $\alpha$ -Actina ( $\mu\text{g/ml}$ ) y lactato (mmol/l) de los tres subgrupos de edad de los sujetos sedentarios; Sed-1 ( $n=8$ ), Sed-2( $n=8$ ) Sed-3( $n=6$ ). ....	146
Ilustración 45. Regresiones entre $\alpha$ -actina ( $\mu\text{g/ml}$ ) y lactato (mmol/l) de los tres subgrupos de edad de los sujetos recreacionales; Rec-1( $n=8$ ), Rec-2( $n=10$ ), Rec-3( $n=8$ ). ....	146
Ilustración 46. Regresiones entre $\alpha$ -actina ( $\mu\text{g/ml}$ ) y lactato (mmol/l) de los tres subgrupos de edad de los sujetos élites; Eli-1 ( $n=7$ ); Eli-2( $n=8$ ); Eli-3 ( $n=7$ ). ....	147
Ilustración 47. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de DNA HEAD O ADN EN CABEZA (%) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo .	148
Ilustración 48. Los resultados representan la media $\pm$ EEM DNA TAIL O DNA EN COLA (%) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. ....	148
Ilustración 49. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de la concentración plasmática de TBAR's (nmol/ml MDA) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo .....	149
Ilustración 50. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de la concentración plasmática de Hidroperóxidos, de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. ....	150
Ilustración 51. Los resultados representan la media $\pm$ EEM de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (U/mg), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). $n=8$ en cada subgrupo. ....	151

<i>Ilustración 52. Los resultados representan la media <math>\pm</math>EEM de la actividad enzimática de la Catalasa (seg-1mg-1), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas (<math>p &lt; 0,05</math>). n=8 en cada subgrupo. ....</i>	<i>152</i>
<i>Ilustración 53. Los resultados representan la media <math>\pm</math>EEM de la actividad enzimática de la Glutation Peroxidasa (U/mg), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas (<math>p &lt; 0,05</math>). n=8 en cada subgrupo. ....</i>	<i>152</i>
<i>Ilustración 54. Los resultados representan la media <math>\pm</math>EEM de la actividad enzimática de la Glutation Reductasa (U/mg), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas (<math>p &lt; 0,05</math>). n=8 en cada subgrupo. ....</i>	<i>153</i>
<i>Ilustración 55. Los resultados representan la media <math>\pm</math>EEM de las concentraciones del antioxidante Retinol (nmol/ml) en plasma, de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas (<math>p &lt; 0,05</math>). n=8 en cada subgrupo. ....</i>	<i>154</i>
<i>Ilustración 56. Los resultados representan la media <math>\pm</math>EEM de las concentraciones de antioxidante <math>\alpha</math>-tocoferol (nmol/ml) en plasma, de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas (<math>p &lt; 0,05</math>). n=8 en cada subgrupo. ....</i>	<i>155</i>
<i>Ilustración 57. Los resultados representan la media <math>\pm</math>EEM de las concentraciones del antioxidante Retinol (nmol/ml) en plasma, de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas (<math>p &lt; 0,05</math>). n=8 en cada subgrupo. ....</i>	<i>156</i>
<i>Ilustración 58. Los resultados representan la media <math>\pm</math>EEM de los incrementos de concentración en suero de la proteína <math>\alpha</math>- actina de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas (<math>p &lt; 0,05</math>). n=8 en cada subgrupo</i>	<i>169</i>



## Índice De Tablas.

Tabla 1. Clasificación de los Radicales Libres modificada de Finaud, y col. (2006). .....	17
Tabla 2. Clasificación de los radicales libres y especies reactivas de Finaud et al. (2006).....	21
Tabla 3. Principales aminoácidos diana de EROS. Productos de oxidación de los aminoácidos. ....	36
Tabla 4. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos modificados de Powers y col., (1999). .....	44
Tabla 5. Esquema de antioxidantes según origen, localización y mecanismo de acción. Tomada de modificada de Ferreira y col; (2007). ....	45
Tabla 6. Clasificación de los sistemas antioxidantes según el grado de defensa. Tomado de Rusanova, y col., (2010). ....	46
Tabla 7. Clasificación de los principales antioxidante en función de su tipología y localización. Tomado de Blasco, R; (2009). ....	46
Tabla 8. Clasificación general de los antioxidantes no enzimáticos en función de su acción. .....	47
Tabla 9. Propiedades de los isoformas de la enzima SOD en humanos. Tomado de Powers and Jackson (2008). ....	50
Tabla 10. Estudios del efecto del tratamiento con NAC en diferentes ejercicios submáximos. Tomado de (Powers y Jackson, 2008). ....	71
Tabla 11. Investigaciones que relacionan la producción de Radicales Libres con la práctica deportiva predominantemente aeróbica. Tomado de, De la Cruz (2006). ....	79
Tabla 12. Medias $\pm$ EEM de edad, peso corporal, estatura y horas de entrenamiento semanal, de los sujetos participantes en el estudio. ....	96
Tabla 13. Relación de concentración de Hidroperóxidos. ....	111
Tabla 14. Diferentes concentraciones de Actina. ....	124
Tabla 15. Características antropométricas de los sujetos participantes en el estudio. ....	133
Tabla 16. Valores promedios de los parámetros analizados en la bioquímica general de los subgrupos evaluados en el estudio. ....	138



**CAPÍTULO I**  
**JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



### 1.1. Justificación

Esta Tesis Doctoral fue becada por Consejo Superior de Deportes (Ministerio de Educación y Ciencia) como proyecto nº 03/UPB31/10 de la Universidad de Granada, presentado a la *Convocatoria De Ayudas A Las Universidades Públicas Y Privadas Y Entidades Públicas*, para la realización de proyectos de apoyo científico y tecnológico al deporte, estudios e informes de interés deportivo y otras acciones de promoción y difusión de la investigación deportiva 2010. La finalidad global de esta Tesis Doctoral, es conocer el volumen e intensidad de práctica deportiva cardiovascular que induce máximos beneficios fisiológicos en el proceso de envejecimiento y determinar si la práctica deportiva de competición tiene repercusiones fisiológicas positivas o negativas cuando se alcanzan edades avanzadas.

El envejecimiento es un proceso que tiene grandes connotaciones a nivel socioeconómico, psicológico, morfológico, celular y molecular. Tanto es así que, en los últimos años, el grupo poblacional de la tercera edad está en continuo crecimiento, tanto en número como en proporción con respecto al total de la población, gracias a que las expectativas de vida se han incrementado de forma abrumadora en los últimos veinte años y se espera que siga aumentando. Ello supone una serie de limitaciones para dichos sujetos, tales como, pérdida de la capacidad de movimientos, pérdida de libertad en general, necesidad de asistencia continuada, etc. Por tanto, el coste económico que deben de soportar los gobiernos crece de forma proporcional.

La causa fundamental de muerte en los últimos años de la vida es el incremento de la vulnerabilidad del organismo frente a enfermedades o accidentes; esta vulnerabilidad es mayormente achacable al declinar ineludible de la capacidad funcional a partir de los 30 años.

Todos los factores estudiados con anterioridad determinan en general que la capacidad de realizar cualquier actividad física en edades avanzadas, está muy limitada. Sufrimos un descenso del consumo máximo de oxígeno ( $VO_2\text{max}$ ) de entre 0.5 y 1% por año (Rimmer, 1995). Esto supone que en

sujetos sedentarios sanos, el descenso neto sea de 2.0 l/min y de 1.3 l/min para mujeres y hombres respectivamente de 25 a 85 años de edad. Los sujetos con más de 75 años de edad, generalmente tienen un  $VO_2\text{max}$  de 7 a 14 ml/Kg/min (el equivalente a dos a cuatro METS). No obstante, se pueden observar  $VO_2\text{max}$  de 35 ml/Kg/min (10 METS) en atletas con más de 65 años (Rimmer, 1995). Por ello resaltamos, que las deficiencias que comienzan a producirse en edades avanzada se ven acrecentadas con el estilo de vida sedentario de esta era y sobre todo, con respecto en las personas de la tercera edad. Este concepto del “desuso”, en realidad no es tan nuevo ya que Hipócrates entre el 460 y 377 antes de JC ya decía: “todas las partes del cuerpo que desempeñan una función, si son usadas con moderación y ejercitadas en labores a las que se habitúan, se harán saludables, bien desarrolladas y envejecerán lentamente, pero si no se usan y se dejan desocupadas, se hacen propensas a enfermar, defectuosas en su desarrollo y envejecen rápidamente”.

La ambición por encontrar la causa y el remedio contra el envejecimiento ha proporcionado una gran cantidad de teorías. Entre las cerca de 300 catalogadas, una de las más aceptadas actualmente es la teoría del estrés oxidativo y de los radicales libres, donde la mitocondria ocupa un papel primordial por ser uno de los orgánulos de la célula más afectados por las especies reactivas del oxígeno, producidas en la misma mitocondria en el proceso de la respiración celular.

Por otra parte se conoce la importancia de la práctica deportiva en el ámbito de la salud y los beneficios que aporta la actividad física de intensidad media-baja en sujetos de mediana y avanzada edad; El ejercicio físico se ha convertido en uno de los instrumentos que aporta más beneficios “antienvjecimiento” (Finkel & Holbrook, 2000). Pero en contrapartida, la práctica deportiva extenuante y concretamente, el deporte de competición, comporta a una gran adaptación del organismo a esta situación.

La respuesta del músculo esquelético a la realización repetitiva de un deporte intenso, implica dos tipos fundamentales de adaptaciones: hipertrofia

## CAPÍTULO I: Justificación

de las células musculares e incremento de la capacidad del músculo para el metabolismo aeróbico. Como consecuencia del segundo tipo de adaptación, incrementa la capacidad del músculo esquelético a oxidar piruvato y ácidos grasos por la vía aeróbica. En las mitocondrias del músculo, la capacidad de obtener energía de grasa y carbohidratos está acompañada de un incremento paralelo en la capacidad de obtención de ATP vía fosforilación oxidativa.

Todos estos importantes cambios, tienden finalmente a que las mitocondrias de las células musculares vean incrementadas su capacidad de generar energía y por tanto de consumir oxígeno. Ello podría conducir simultáneamente a un aumento en la tasa de formación de radicales libres y peroxidación lipídica endógena, lo que a su vez repercutiría negativamente en la funcionalidad de las membranas celulares y más concretamente en las mitocondriales (desorganización de la membrana mitocondrial, pérdida de fluidez, pérdida paulatina en el rendimiento mitocondrial para la obtención de energía, envejecimiento celular, etc.) (Huertas, Mataix, Manas, Bargossi, & Battino, 1994). En concreto, en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, se genera radical superóxido y peróxido de hidrógeno a una tasa que oscila entre un 3% a bajo  $VO_2\max$  y hasta un 10% en ejercicios submáximos (Huertas, et al., 1994). Una producción elevada y no controlada de radicales libres está implicada a largo plazo en la destrucción tisular, varias formas de cáncer, desórdenes inmunológicos, isquemia miocárdica y cerebral, artritis reumatoide, distrofias musculares, etc. (Huertas, et al., 1994).

Estudios previos de nuestro grupo de investigación, realizados en ratas wistar, han demostrado que la actividad física crónica determina un aumento significativo de los marcadores de estrés oxidativo (J.L. Quiles et al., 1994; J.L. Quiles et al., 1998) (J.L. Quiles, et al., 1998);(J Mataix, Quiles, Huertas, Battino, & Mañas, 1998);(J.L. Quiles et al., 1999a; J.L. Quiles et al., 1999b); (J.L. Quiles et al., 2001);(J.L. Quiles et al., 2003). Más recientemente también hemos demostrado que es el ADN mitocondrial el elemento más vulnerable al estrés oxidativo asociado a la edad, con incrementos de deleciones significativas que corroborarían la teoría mitocondrial del envejecimiento por la acción de los radicales libres del oxígeno (J.L; Quiles et al., 2004) (J.L. Quiles et al., 2005)

(J.L. Quiles, Ochoa, Ramirez-Tortosa, Huertas, & Mataix, 2006) esta teoría, apunta a que el envejecimiento es el resultado de un declive energético celular, debido a mutaciones somáticas casuales y acumulativas del ADN mitocondrial como consecuencia de los radicales libres (J. Miquel & Ramírez-Bosca, 2004); (Sastre, Pallardó, & Viña, 2000); (J. Miquel, Economos, & Fleming, 1980).

Por tanto, teniendo en cuenta esta teoría del envejecimiento y que los sujetos que realizan deporte de élite a lo largo de su vida, consumirán un mayor volumen de oxígeno que los sujetos sedentarios, nos planteamos la hipótesis de que estos podrían, a una edad dada, presentar marcadores de envejecimiento más elevados con respecto a sujetos sedentarios y/o que realizan menos volumen de práctica deportiva.

No obstante nuestro estudio no está exento de limitaciones, de entre las más importantes, destaca la cuestión referente a si los atletas podrían desarrollar mecanismos de defensa más eficientes y que estos se mantuvieran en el tiempo.

En cualquier caso, no hay estudios longitudinales ni transversales que comprueben marcadores del impacto del estrés oxidativo por práctica deportiva y los relacionen con el envejecimiento. Por ello, en nuestro estudio pretendemos determinar qué intensidad y volumen de ejercicio físico es el que aporta mayores beneficios a lo largo de la vida y que podría contribuir a una mejora estructural y funcional de nuestro organismo frente al proceso de deterioro producido por el envejecimiento.



## 1.2. Objetivos de la investigación

### 1.2.1. Objetivo General

Conocer qué volumen e intensidad de práctica deportiva aeróbica aporta mayores beneficios frente al proceso de envejecimiento.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Conocer si existen efectos negativos por la práctica deportiva de predominio aeróbico en los procesos de envejecimiento.
- Justificar si la práctica deportiva de tipo recreacional mantiene los niveles de defensa antioxidante adecuados para prevenir el envejecimiento.
- Dilucidar la controversia existente sobre si la práctica deportiva de élite, con predominio aeróbico, genera un aumento del envejecimiento celular.
- Determinar la intensidad y volumen de ejercicio más adecuados para la prevención de enfermedades asociadas a la senectud.



**CAPÍTULO II**  
**ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**



### 2.1. Importancia del oxígeno en la vida

En tiempos anteriores al origen de la vida, la atmósfera era notablemente reductora y carente de oxígeno, pues de haber existido éste, las primeras moléculas habrían sido destruidas por oxidación. Actualmente la concentración de oxígeno en la Tierra es producto de la evolución del balance bioquímico y biofisiológico entre animales, quienes consumen oxígeno y plantas quienes lo generan a partir del proceso biológico de la fotosíntesis

La Tierra se formó hace aproximadamente 4.530 millones de años. Se estima que durante los primeros 1500 millones de años se formaron compuestos orgánicos a partir de componentes atmosféricos tales como el hidrógeno, amoníaco, agua y metano; bajo la activación producida por la luz ultravioleta solar, por descargas eléctricas, por ondas de choque, por el calor y otras formas de energía existentes en aquellos inicios.

El oxígeno no estuvo presente en la Tierra hasta mucho más tarde. Se piensa que hizo su aparición principalmente como producto de la fotosíntesis de plantas acuáticas, de la descomposición del agua por la acción del sol y de su producción en el interior de la Tierra y su evaporación. De forma progresiva y pausada la atmósfera se fue transformando en un espacio rico en este elemento hasta llegar a los valores actuales. Esta disposición facilitó el origen de la vida en nuestro planeta por tres principales razones:

1. Aparición de la Capa de Ozono: la cual evitaría que las radiaciones ultravioletas solares alcanzaran directamente a la Tierra y destruyesen la vida en ella.
2. Desarrollo de mecanismos biológicos-enzimáticos de autodefensa de la célula contra la oxidación (superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, citocromoxidasas).
3. Origen de la respiración celular aeróbica: el oxígeno sería utilizado por la célula para su respiración y producción de energía (ATP); lo que constituyó una ventaja, ya que se pudieron degradar

completamente los componentes orgánicos y disponer de una mayor riqueza bioenergética. Así, los organismos vivos pasaron de una respiración anaerobia (fermentación o glucólisis: 2 ATP por molécula de glucosa) a una aerobia que permite la síntesis de un mayor número de moléculas de ATP (38 por molécula de glucosa). Sin esta energía no hay vida orgánica, ni vegetal, ni animal, ni humana.

Por tanto, el oxígeno, de enemigo fundamentalmente de los organismos anaerobios, pasó a ser necesario e imprescindible para los aerobios y por ende para el desarrollo del hombre; y se convirtió en un elemento vital. “La lucha por mantener la vida orgánica es una guerra por la energía libre” planteó Gibbs, creador de la termodinámica.

Actualmente el oxígeno es el elemento más abundante de la composición de la Tierra con el 27,7%: de cada 5 moléculas de gas atmosférico, una es de oxígeno.

Como comentó Halliwell en 1999, el oxígeno que respiramos es metabolizado en nuestro organismo de la siguiente manera: aproximadamente el 85-90% de este compuesto es utilizado por la mitocondria a través de la cadena de transporte de electrones como medio de obtención de energía; el 10-15% restante es utilizado por diversas enzimas oxidasas y oxigenasas y también por reacciones químicas de oxidación directa. Del 85-90% del oxígeno aprovechado por las mitocondrias, del 2 al 5% son reducidos a metabolitos denominados Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) también llamados Radicales Libres, las cuales tienden a reaccionar con otras moléculas produciendo desequilibrios y un daño que puede afectar a sistemas biológicos importantes generando posteriormente la muerte celular.

## **2.2. Concepto y principios del envejecimiento**

El envejecimiento es un proceso irreversible que afecta de forma compleja a todas las células que constituyen el organismo de los seres vivos.

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

La enciclopedia británica define el proceso de envejecimiento como: “El cambio gradual e intrínseco en un organismo que conduce a un riesgo creciente de vulnerabilidad, pérdida de vigor, enfermedad y muerte. Tiene lugar en una célula, en un órgano o en la totalidad del organismo de cualquier ser vivo, durante el periodo vital completo como adulto”. La senectud es fenómeno común a todos los organismos multicelulares que ha sido descrito como un declive endógeno y progresivo en la eficacia de los procesos fisiológicos tras la fase reproductora de la vida (Barja, 2002; Camougrand & Rigoulet, 2001; Halliwell, 1999).

Desde 1840, las expectativas de vida han ido aumentando en los países desarrollados a razón de tres meses por año. Una buena noticia es que la salud ha mejorado, sin embargo el coste en salud ha ido creciendo en relación a la aparición de enfermedades que hace 100 años no se conocían, como el Alzheimer, la degeneración macular asociada al envejecimiento (principal causa de ceguera en la actualidad), diversas enfermedades de tipo cardiovascular, cáncer, etc. (Barja, 2002; Camougrand & Rigoulet, 2001; Halliwell, 1999).

Según explican las teorías del envejecimiento, todo ser vivo nace, se reproduce y finalmente muere debido al deterioro morfológico y funcional de sus células con el paso del tiempo. Está contrastado que la base de este detrimento celular es tanto de carácter génico como ambiental. Son abundantes las suposiciones que pretenden dar una explicación a este hecho. Numerosas teorías han sido propuestas, pero sólo las que son capaces de explicar la pérdida de homeostasis al final de la vida, las variaciones en la duración de ésta, entre grupos o la extensión de la existencia mediante mutaciones o regímenes experimentales, deben ser tenidas en cuenta. Frente a la diversidad de teorías de envejecimiento, podemos encontrar entre las más aceptadas, la Teoría sobre el envejecimiento de Harman asociada estrechamente a la aparición de las especies reactivas del oxígeno en nuestro organismo y que lleva por nombre: Teoría de los Radicales Libres.

## 2.3. Teoría de los radicales libres

Vivimos en una atmósfera oxigenada, y por lo tanto oxidante. El oxígeno ambiental promueve el metabolismo celular, produciendo energía a través de la cadena respiratoria. Como la utilización y manejo del O<sub>2</sub> no es perfecto, se producen los denominados Radicales Libres.

La Teoría de los RL fue propuesta en 1956, indicando que el envejecimiento sería el resultado de una inadecuada protección contra el daño producido en los tejidos celulares por los denominados Radicales Libres durante la respiración aerobia, (Harman, 1956).

Los Radicales Libres se forman durante el proceso oxidativo del metabolismo normal y reaccionan con los componentes celulares. Éstas reacciones pueden estar implicadas en la producción de los cambios del envejecimiento, asociados con el medio ambiente, enfermedad y con su proceso intrínseco originando la muerte de células vitales y, finalmente, el envejecimiento y la muerte del organismo.

Un Radical Libre es cualquier especie química de existencia independiente, muy inestable y con gran poder reactivo ya que contiene uno o más electrones desapareados; entendiéndose como electrón desapareado, aquél que no tiene su espín compensado por otro electrón de espín opuesto en el mismo átomo, es decir, sólo poseen un electrón en una órbita (Halliwell, 1999). Los radicales libres pueden formarse por la pérdida de un solo electrón de una molécula neutra, por adición de un electrón de una molécula neutra, o monolítica para romper un enlace covalente, con la formación de dos radicales. La disparidad electrónica empuja al radical a la búsqueda de otro electrón para formar un doblete (Cheeseman & Slater, 1993). Esto le da una "alta reactividad" con retroalimentación constante del orden de  $10^5 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , para reaccionar en vivo con una gran variedad de sustratos orgánicos: carbohidratos, proteínas y enzimas, ácidos grasos poliinsaturados y con 'ácido desoxirribonucleico (ADN) (Jiang, Woollard, & Wolff, 1990), siendo los lípidos los más vulnerables. Por ello, los Radicales Libres son moléculas inestables y



## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

altamente reactivas con uno o más electrones no apareados, que producen daño a su alrededor a través de reacciones oxidativas de sustratos energéticos y diversas reacciones enzimáticas (Beckman & Ames, 1998; Finaud, Lac, & Filaire, 2006). Se cree que este tipo de daño podría causar alteraciones en los cromosomas y en ciertas macromoléculas como colágeno, elastina, mucopolisacáridos, lípidos, etc,

Esta teoría fue reforzada 1969 con la identificación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) como indicador de la generación de iones superóxido y actuando como antioxidante (Beckman & Ames, 1998). Diversos estudios relacionan el efecto de los RL con el proceso de envejecimiento. La lipofucsina, llamada también "pigmento del envejecimiento", se corresponde con la acumulación de orgánulos subcelulares oxidados. Se ha encontrado una buena correlación entre los niveles celulares de superóxido dismutasa (enzima de acción antioxidante) y la longevidad de diferentes primates. Además, estudios en ratas sometidas a restricción calórica han mostrado un aumento en la longevidad de éstas, lo que se cree es debido a una menor producción de radicales libres. Pero, por otro lado, no hay estudios que hayan demostrado que animales sometidos a dietas ricas en antioxidantes logren incrementar su supervivencia.

Desgraciadamente, faltan más estudios para lograr comprender a fondo el rol de los radicales libres en el proceso de envejecimiento. Lo que sí está claro, es el importante papel que juega el daño producido por la liberación de RL en ciertas patologías relacionadas con el envejecimiento, tales como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas, enfermedad de Alzheimer, entre otras. Según la evidencia con la que contamos hasta el momento, si logramos disminuir la generación de radicales libres o neutralizamos su daño, lograríamos disminuir estas enfermedades; entonces, seríamos capaces de prevenir una muerte precoz por estas patologías. Lo que continua sin esclarecerse sería la hipótesis de si logrando disminuir el daño por RL lograríamos aumentar la longevidad.

Con esta teoría Harman pretendía explicar varios aspectos:

1. El origen de la vida y su evolución.
2. El aumento de la longevidad en especies animales sometidas a manipulaciones dietéticas y ambientales.
3. El proceso de envejecimiento.
4. El gran número de enfermedades en cuya patogenia están implicados los radicales libres del oxígeno.

## **2.4. Estrés Oxidativo: Especies Reactivas Del Oxígeno**

El estrés oxidativo fue definido como el desequilibrio entre agentes prooxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Sies & Cadenas, 1985). Éste puede deberse a un exceso de agentes prooxidantes, a una deficiencia de agentes antioxidantes o a ambos factores a la vez. Estos agentes prooxidantes nacen de la reducción parcial del oxígeno a través de una serie de transferencias monoelectrónicas. La razón de estas reducciones monoelectrónicas es que la molécula de oxígeno posee 2 electrones desapareados en orbitales X antienlazantes, lo que disminuye su capacidad de reacción y hace que se vea obligado a aceptar los electrones de uno en uno. La cadena reductora del oxígeno da a lugar a diversas moléculas denominadas RL o Especies Reactivas Del Oxígeno (EROS).

Los RL se caracterizan por una gran reactividad con diversas moléculas y alta capacidad para recibir electrones (Jenkins, 1988), y esto mismo, es lo que designa su alta toxicidad y los relaciona con la producción de daño oxidativo en diversas moléculas del organismo (Halliwell, 1999), dando a lugar reacciones en cadena. La mayor parte de los RL de interés derivan del oxígeno y por ello son denominados como Especies Reactivas Del Oxígeno, EROS (Vina et al., 2000).

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

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

Existen diversas EROS generadas a partir de la cadena de reacciones originada por la reducción del oxígeno y con distinta vida media y efectos en el organismo, como se muestran en la Tabla 1.

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

La primera especie reactiva del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , se denomina anión superóxido y se produce a partir de la reducción del oxígeno que consumimos (**Reacción 1**). Del 2 al 5% de éste se reduce mediante las cadenas respiratorias en el transcurso del metabolismo aeróbico para quedar transformado en anión superóxido. (K. J. A. Davies, Quintanilha, Brooks, & Packer, 1982). A partir de aquí se desarrollan 3 reacciones principales del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  que derivan en nuevas

EROS; además este radical puede reaccionar rápidamente con otros radicales como: óxido nítrico (NO) y con hierro (Fe) y azufre (S) de proteínas. En la actualidad se estudia la posibilidad de que el radical superóxido al recibir un protón, de a lugar a la formación del radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>). Con lo cual, tenemos ante nosotros, a la especie primaria de la que proceden la mayoría de EROS.

- **Reacción 1:**  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$
- **Reacción 2:**  $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- **Reacción 3:** (*Reacción Fenton*)  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{\cdot}$
- **Reacción 4:** (*Reacción Haber-Weiss*)  $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{Fe^{3+}/Cu^{2+}} O_2 + OH^{\cdot} + OH^{\cdot}$

**Reacción 2:** La dismutación del radical superóxido, da a lugar a peróxido de hidrógeno, un nuevo radical capaz de reaccionar con diversas estructuras celulares. Este proceso de dismutación tanto de forma espontánea como catalizada por la SOD, son importantes fuentes de peróxido de hidrogeno en las células (Powers & Jackson, 2008).

**Reacción 3:** A su vez el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de hierro puede generar radical hidroxilo, caracterizado por ser uno de los radicales con mayor reactividad y elevado daño a las estructuras celulares.

**Reacción 4:** El Fe<sup>3+</sup> puede ser nuevamente reducido a Fe<sup>2+</sup>, bajo la acción del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (reacción de Haber-Weiss -4),(Finaud, et al., 2006).

### 2.4.2. Peróxido De Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Se genera de la reducción dielectrónica del oxígeno, recibiendo un electrón más y dos iones de hidrógeno mediante un proceso denominado dismutación.



Esta reacción es catalizada por la enzima SOD, la cual acelera la reacción en 10 veces en un pH fisiológico. Es una molécula bastante estable, parecida al agua por lo que puede atravesar con facilidad la membrana celular y aunque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no reacciona directamente con el ADN o los lípidos, es capaz de inactivar algunas enzimas y reaccionar con metales derivando otras EROS, como el ión OH<sup>-</sup>, mayor tóxico entre las EROS (Finaud, et al., 2006; Powers & Jackson, 2008). Hemos de resaltar por lo tanto, que el peróxido de hidrógeno no es propiamente un RL ya que no posee ningún electrón desapareado; es considerado una Especie Reactiva del Oxígeno por su capacidad tóxica y su participación en la formación de otras EROS.

### 2.4.3. Radical Hidroxilo (OH<sup>•</sup>).

Cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recibe un electrón más y un ion de hidrógeno se forma el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>). Este radical puede formarse cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combina con hierro o cobre mediante la denominada reacción de Fenton. Este es el más reactivo y tóxico de los radicales intermediarios y de fuerte potencial oxidante, pudiendo alterar cualquier estructura celular o incluso enzimas, membranas o ácidos nucleicos. No es permeable a la membrana y produce peroxidación lipídica y oxidación de las proteínas (Finaud, et al., 2006; Powers & Jackson, 2008).



Los metales de transición como el Fe, el Cu o el níquel pueden catalizar la reacción entre peróxido de hidrógeno y anión superóxido generando finalmente radical hidroxilo mediante la denominada reacción de Haber-Weiss.



### 2.4.4. Oxígeno Singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)

Otra especie reactiva del oxígeno es el oxígeno singlet O<sub>2</sub>. No es un RL ya que no posee electrones desapareados, pero es una especie altamente

reactiva del oxígeno. Es permeable a la membrana, un gran oxidante y su vida media es muy corta. El oxígeno singlete está vinculado a la oxidación del colesterol LDL y a sus consiguientes efectos cardiovasculares. Los polifenoles antioxidantes pueden recoger y reducir las concentraciones de estas especies de oxígeno reactivo, y por tanto pueden evitar tales efectos nocivos oxidativos (Karp, 2005). Se ha descrito que la dismutación del ión superóxido en agua puede conducir a la formación de este radical en los sistemas biológicos (Powers & Jackson, 2008).

#### 2.4.5. Especies reactivas del nitrógeno

Las especies reactivas del nitrógeno son una familia de moléculas derivadas del óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) producido por la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa 2 ( $\text{NOS}_2$ ). Son producidas en animales a través de la reacción del óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) con superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un radical con características similares al radical hidroxilo. (Droge, 2002).



#### 2.4.6. Especies Reactivas del Sulfuro

Los átomos de sulfuro pueden también ser el centro para RL formados, (RS), como es el caso de la oxidación del glutatión (Bulkley, 1988; Cheeseman & Slater, 1993) y se encuentran relacionados con el daño hepático.

#### 2.4.7. Especies reactivas secundarias

Asimismo, estas EROS al reaccionar con lípidos insaturados (peroxidación lipídica), proteínas o ácidos nucleicos pueden generar otras especies reactivas como son los radicales hidroperoxilo y peroxilo, alcóxido y el radical alquilo, las cuales pueden generar oxidación por sí solas. En la tabla 2 se enumeran los principales activos de especies conocidas.

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

*Tabla 2. Clasificación de los radicales libres y especies reactivas de Finaud et al. (2006).*

Radical Libre	Abreviatura	Vida media	Principales Efectos
<b>Especies Reactivas del Oxígeno</b>		<b>EROS</b>	
Ion superóxido	$O_2^-$	10-5 seg.	
Ozono	$O_3$	Estable	
Oxígeno Singlet	$^1O_2$	1 $\mu$ seg	
Radical hidroxilo	$OH^\cdot$	10-9 seg.	Oxidación lipídica, proteica y peroxidación.
Peróxido de Hidrógeno	$H_2O_2$	Estable	
Ácido Hipocloroso	HO CL	Estable	Daño en ADN
Radical Alcoxilo	$RO^\cdot$	10-6 seg.	
Radical Peroxilo	$ROO^\cdot$	7 seg.	
Radical Hidroperoxilo	$ROOH^\cdot$		
<b>Especies Reactivas del Nitrógeno</b>		<b>ERNs</b>	
Óxido Nítrico	$NO^-$		Peroxidación lipídica
			Daño en el ADN
Dióxido Nítrico	$NO_2^-$	1 -10seg	Oxidación de proteínas
Peroxinitrito	$ONOO^-$	0,05 -1seg	
<b>Especies Reactivas del Sulfuro</b>		<b>EROS</b>	
			Oxidación de proteínas
Radical Sulfuro	$RS$		Daño en el ADN
			Producción de EROS

## 2.5. Estrés Oxidativo A Nivel Molecular

### 2.5.1. Posibles Mecanismos Productores De Estrés Oxidativo

Como bien definió Alessio en 1993, la acción lesiva de los RL sobre las moléculas se conoce como estrés oxidativo o daño oxidativo. Los RL se están produciendo continuamente en nuestro organismo y poseen un papel importante en el desarrollo de diversos procesos biológicos; por ello, y en principio, no suponen ningún problema para los seres vivos ya que existen sistemas endógenos antioxidantes capaces de neutralizarlos. El daño aparece cuando en equilibrio producción/neutralización se rompe y el sistema antioxidante se ve desbordado, de esta forma los RL se convierten en compuestos nocivos que pueden llegar a ser los responsables de diferentes tipos de patologías (Anggard, 1994).

Existen varias fuentes de generación de Radicales Libres, EROS y ERON, que se producen de forma exógena por causas como: alta ingesta calórica, polución ambiental, tabaquismo, alcohol, deporte, o en resumen, cualquier actividad que genere un aumento del consumo de oxígeno y por consiguiente pueda derivar en un estado agudo de estrés oxidativo. (Fisher Wellman & Bloomer, 2009);(Finaud, et al., 2006).

A continuación abordamos las principales fuentes endógenas de producción de radicales libres son:

#### 2.5.1.1. *La Cadena Respiratoria Mitocondrial*

La mitocondria (Ilustración 1), es considerada desde 1972 la mayor fuente de RL, debido a que en condiciones normales el 5% del oxígeno consumido se escapa del procesamiento mitocondrial, formándose EROs a partir de este orgánulo (Boveris, Chance, & Oshino, 1972).



## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

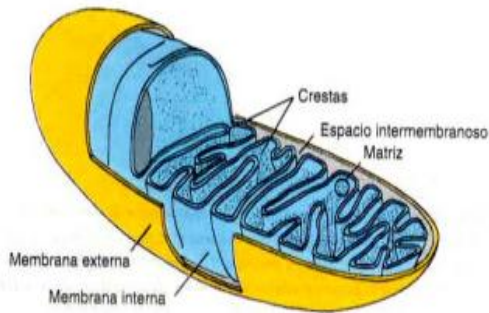


Ilustración 1. Representación esquemática de una mitocondria funcional. Tomado de Stryer (1995).

de electrones (CTE) (Ilustración 2), en la cuál se usa el oxígeno como aceptor de electrones y proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Fisher Wellman & Bloomer, 2009); (Powers & Jackson, 2008);(Fisher Wellman & Bloomer, 2009).

Además la mitocondria tiene como principal función la producción de energía sintetizando moléculas de ATP a través de procesos fundamentales en presencia de oxígeno como son, el Ciclo de Krebs, la cadena de transporte

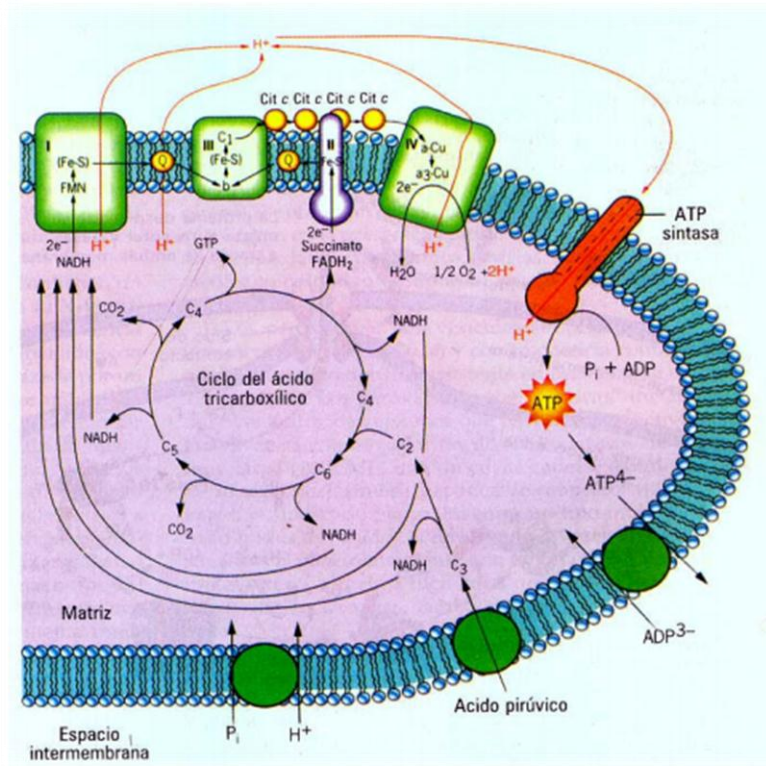


Ilustración 2. Resumen de los principales procesos que ocurren durante la respiración aerobia en una mitocondria. Tomado de Karp y col; (1996).

Del 95% al 99% del oxígeno consumido en la CTE es reducido a agua por la reducción tetravalente, catalizada por la coenzima Q (CoQ) (Finaud, et al., 2006).



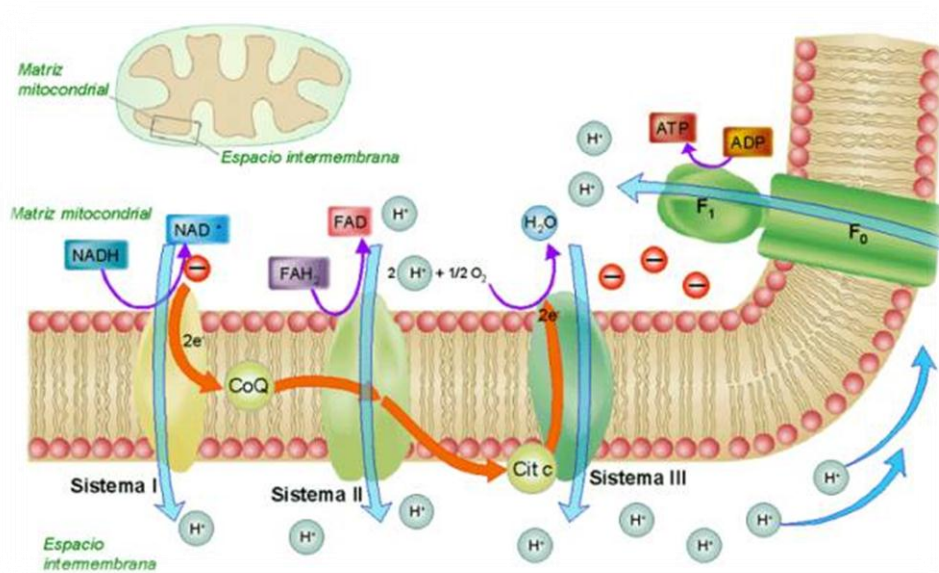
El sistema mitocondrial de transporte de electrones (Ilustración 3), responsable de la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , está formado por 4 complejos multienzimáticos dependientes de un apropiado entorno lipídico (Beckman & Ames, 1998), tales como:

**Complejo I** (NADH deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa) capta dos electrones del NADH y los transfiere a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q). El producto reducido, que se conoce con el nombre de ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ) puede difundir libremente por la membrana. Al mismo tiempo el Complejo I traslada cuatro protones a través de membrana, produciendo un gradiente de protones. El flujo de electrones ocurre con la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$  y la reducción al FMN a  $\text{FMNH}_2$  en un único paso que implica a dos electrones. El siguiente transportador de electrones es un centro Fe-S que sólo puede aceptar un electrón y transferirlo a la ubiquinona generando una forma reducida denominada semiquinona. Esta semiquinona vuelve a ser reducida con el otro electrón que quedaba generando el ubiquinol,  $\text{QH}_2$ . Durante este proceso, cuatro protones son transportados a través de la membrana interna mitocondrial, desde la matriz hacia el espacio intermembrana.

- **Complejo II** (Succinato deshidrogenasa): Es la única enzima del ciclo de Krebs asociado a membrana. Este complejo dona electrones a la ubiquinona desde el succinato y los transfiere vía FAD a la ubiquinona.
- **Complejo III** (Complejo citocromo bc1): obtiene dos electrones desde  $\text{QH}_2$  y se los transfiere a dos moléculas de citocromo c, que es un transportador de electrones hidrosoluble que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. Al mismo tiempo, traspasa dos protones a través de la membrana por los dos electrones transportados desde el ubiquinol.

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

- **Complejo IV** (Citocromo c oxidasa): capta cuatro electrones de las cuatro moléculas de citocromo c y se transfieren al oxígeno ( $O_2$ ), para producir dos moléculas de agua ( $H_2O$ ). Al mismo tiempo se translocan cuatro protones al espacio intermembrana, por los cuatro electrones. Además "desaparecen" de la matriz 4 protones que forman parte del  $H_2O$ .



*Ilustración 3. Cadena de transporte de electrones mitocondrial.*

Sin embargo el transporte de electrones mitocondrial no es 100 % eficiente, y en varios puntos se puede producir una reducción monovalente del  $O_2$  y producir  $O_2^{\cdot -}$ . Seguidamente, parte del radical superóxido formado, puede sufrir una dismutación por la SOD para formar  $H_2O_2$ , subproducto característico de la secuencia de reacciones oxidación/ reducción mitocondrial, dando a lugar a diferentes EROS. Los lugares de mayor producción de EROS, complejo I y complejo III, son mostrados en la Ilustración 4.

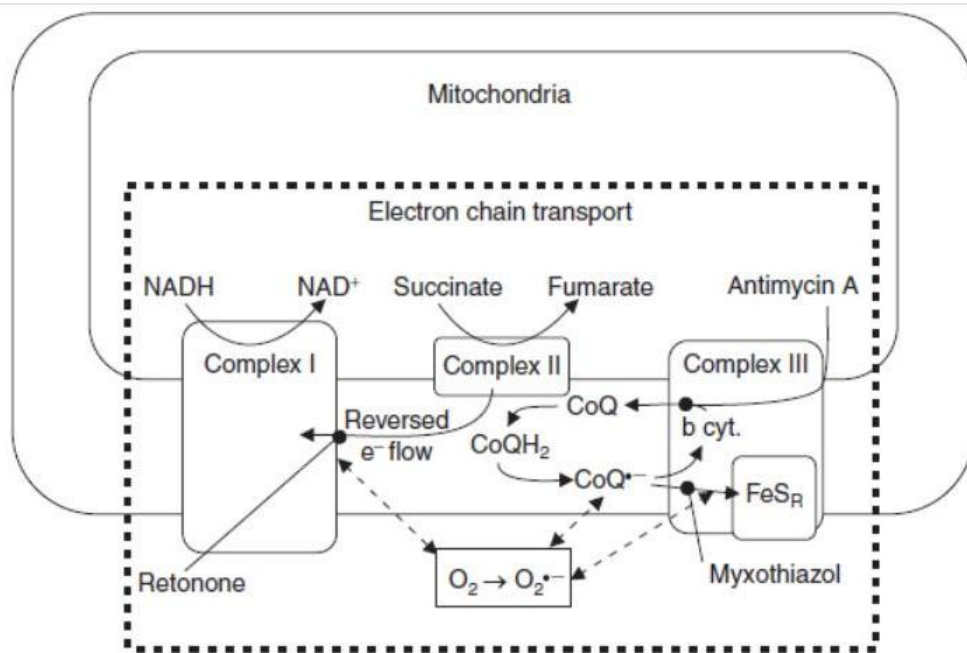
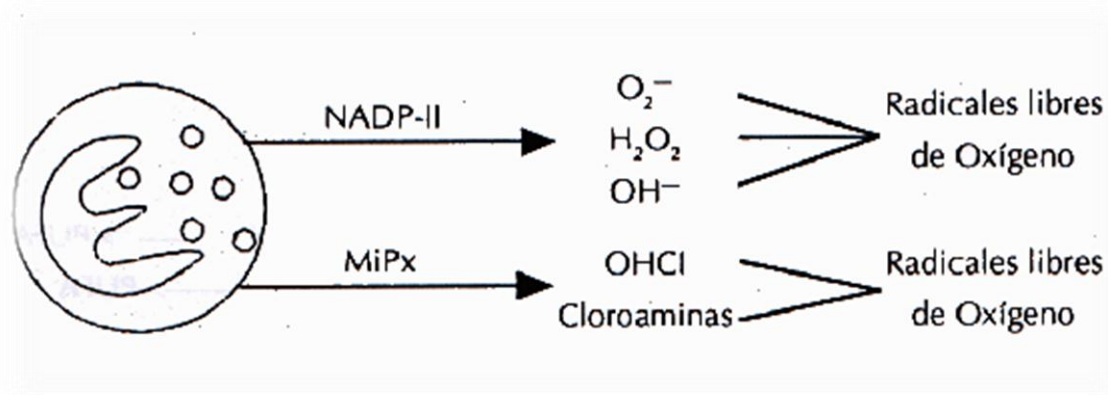


Ilustración 4. Posible localización de formación de EROs mitocondrial dentro de la CTE. Tomado de Finaud y cols, (2006).

### 2.5.1.2. Fagocitosis

Los fagocitos utilizan las especies reactivas del oxígeno como armas de destrucción de patógenos (Ilustración 5). El daño producido tras el ejercicio físico intenso puede desembocar en un proceso inflamatorio que activa la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH). Esta enzima está localizada en la membrana plasmática de los neutrófilos y produce intencionadamente superóxidos; tras una dismutación espontánea, éstos dan a lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ante un estímulo inmune, los neutrófilos liberan mieloperoxidasa al medio extracelular y ésta combina con el (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para formar un complejo enzimático con potencial antioxidante; finalmente este complejo oxida al ion cloruro para formar ácido hipocloroso. El ion superóxido, el peróxido de hidrógeno y ésta última molécula resultante poseen la capacidad de eliminar una infección patógena. El problema persiste como está descrito, en que en los lugares de inflamación generados por la acción de estas moléculas se producen especies reactivas del oxígeno que pueden ser liberadas al medio extracelular (Babior & Woodman, 1990); de hecho está descrito que el estallido oxidativo producido en los

leucocitos marginales del músculo esquelético pueden causar daño tisular (Weiss, 1989).



*Ilustración 5. Generación de Radicales Libres en el proceso de fagocitosis. Tomado de (Welbourn et al., 1991)*

### **2.5.1.3. Vías de metabolismo de los ácidos grasos: ácido Araquidónico. Intervención de las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa y sistema citocromo P<sub>450</sub> y enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>**

En la oxidación de los ácidos grasos, se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como subproducto y la capacidad de esta ERO para traspasar la membrana puede generar reacciones en cadena y por lo tanto, daño en diferentes estructuras celulares si no es reducido por las enzimas catalasas existentes en los peroxisomas celulares. Actualmente existe la duda de si en condiciones normales, esta fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorece un estrés citosólico de forma significativa.

Por otro lado, además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, pro carcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, etc., las enzimas ciclooxigenasa, lipoxigenasa, PLA<sub>2</sub> y el complejo enzimático citocromo P<sub>450</sub>, participan en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos como es el caso también de el ácido graso esencial, ácido araquidónico, donde se han demostrado liberación de EROS (Ilustración 6).

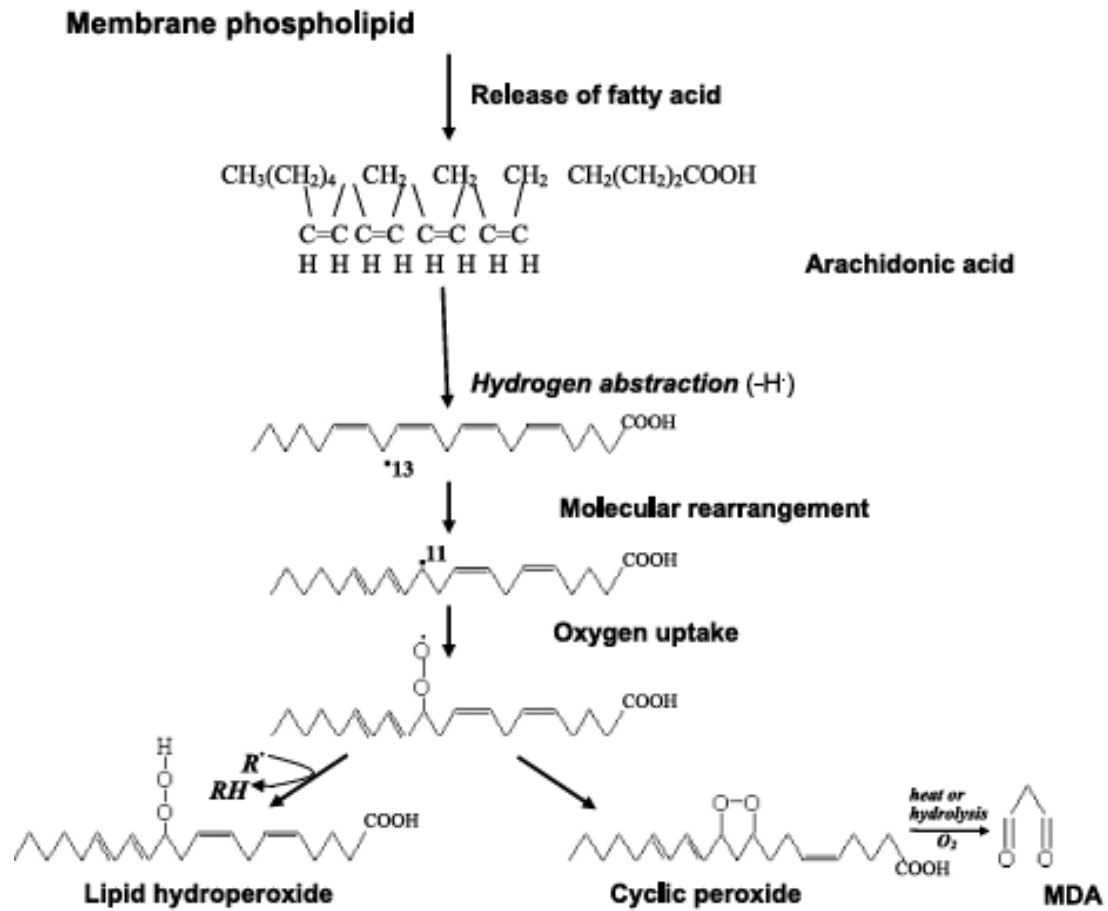


Ilustración 6. Metabolismo del ácido araquidónico y desarrollo de un proceso de peroxidación lipídica con subproducto MDA. Tomado de Powers y Jackson, (2008).

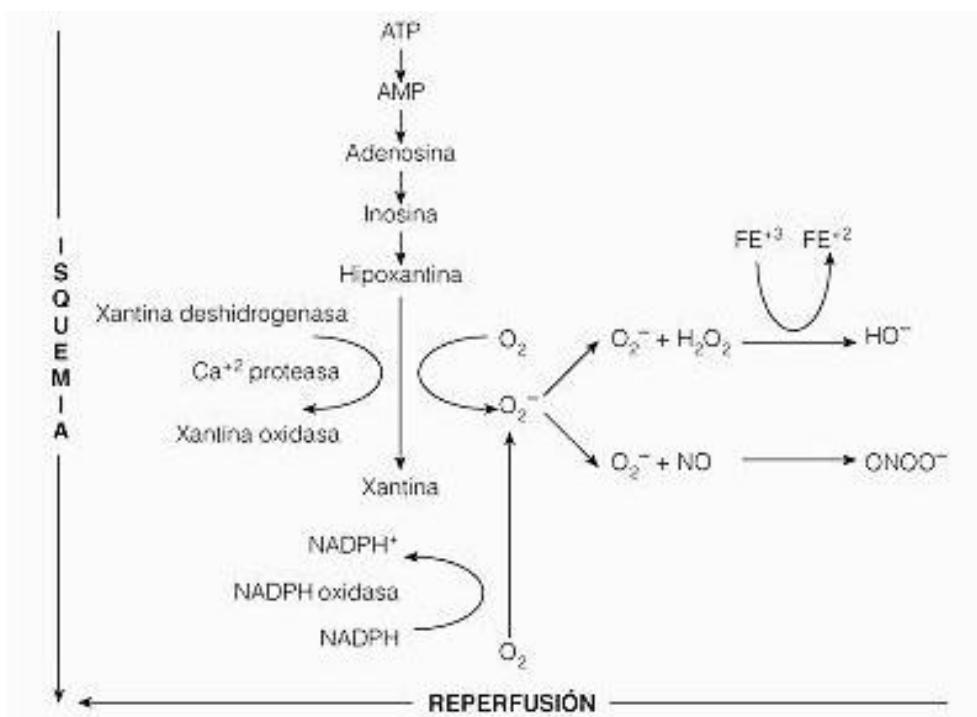
Los procesos enzimáticos asociados a mecanismos de defensa e inflamatorios en los que intervienen las enzimas ciclooxigenasa, lipoxigenasa, están relacionados con una producción de RL (Niess, Dickhuth, Northoff, & Fehrenbach, 1999); al igual que existen evidencias de que en el mecanismo de acción del complejo enzimático P450 situado principalmente en el retículo endoplasmático celular, se generarían especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), además del radical libre sustrato ( $\text{R}^\bullet$ ) que al unirse a un radical hidroxilo, generaría finalmente el producto hidroxilado (ROH) (Beckman & Ames, 1998).

La enzima PLA2, ubicada en el sarcolema de diferentes orgánulos, en el sarcoplasma y en el interior de los lisosomas, utiliza los fosfolípidos de las membranas para síntesis de Ácido araquidónico y es sustrato para la acción de

la ciclo-oxigenasa y de la lipo-oxigenasa, para la formación de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. La producción de ERO por la actividad de la PLA2 es particularmente acentuada por el ejercicio físico (Galván, Guisado Barrilao, García, Ochoa, & Ocaña Wilhelmi, 2008), hipótesis apoyada recientemente (Powers & Jackson, 2008), donde relacionan la contracción muscular y el aumento de la actividad de la PLA2 calcio dependiente y el consecuente incremento de EROS.

### *2.5.1.4. Isquemia / reperusión*

Durante el ejercicio físico la demanda de energía y oxígeno es encabezada por los músculos esqueléticos activos y la piel. La sangre es desviada desde otros órganos (riñones y zonas esplácnicas) generando hipoxia tisular transitoria. Además de esto, durante el ejercicio intenso, las fibras musculares pueden sufrir hipoxias esporádicas ya que el aporte de oxígeno no puede satisfacer la demanda de energía. Cuando la actividad cesa y durante la fase de recuperación del ejercicio, estos tejidos son reoxigenados dando origen a la formación de EROs características de la isquemia/ reperusión (Wolbarsht & Fridovich, 1989).



*Ilustración 7. Fisiología del daño por isquemia reperusión. Tomado de (Welbourn, et al., 1991)*

#### 2.5.1.5. *Actividad de la Xantina Oxidasa*

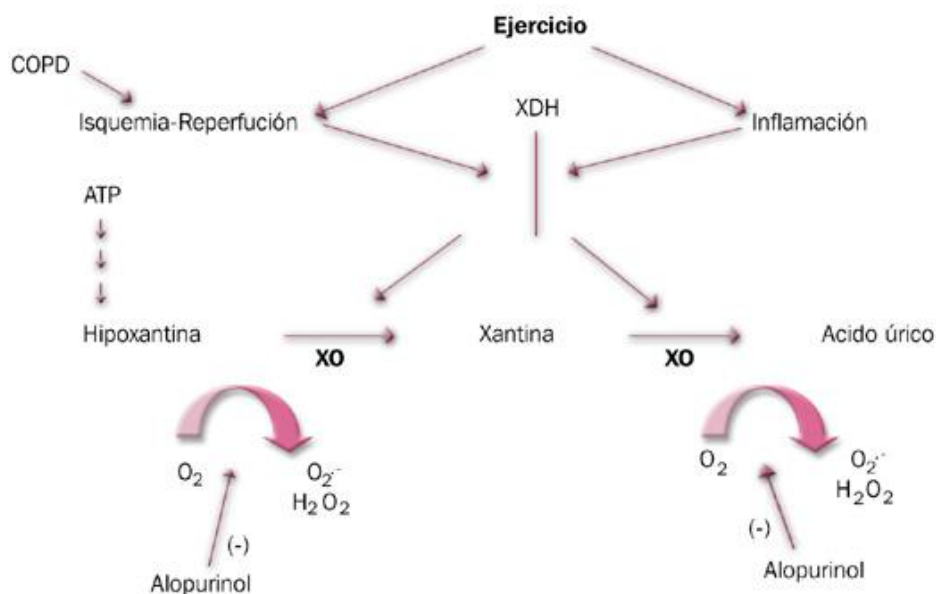
Una manera en la cual la reperfusión podría conducir a un incremento en la producción de EROS es a través de la conversión de la xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XOD). Tanto la XDH como la XOD catalizan la degradación de la hipoxantina (HX) en xantina (X), y subsecuentemente en urato. Sin embargo, sólo XOD produce  $O_2^-$  en el último paso de esta reacción.

En condiciones fisiológicas como hipotensión extrema o isquemia/reperfusión, la xantina deshidrogenasa (XDH), puede convertirse en xantina oxidasa, la cual utiliza oxígeno como aceptor de electrones y produce iones superóxido como resultado de catalizar la oxidación de la hipoxantina a ácido úrico (Hellsten, Frandsen, Orthenblad, Sjodin, & Richter, 1997).

La producción de EROS vía este mecanismo conduce a estrés oxidativo varias horas después del ejercicio, y no está restringido al músculo esquelético. En un estudio reciente, se redujo la tasa de producción de RL significativamente en animales y humanos tras la adición de alopurinol (Ilustración 8), un isómero de la hipoxantina y un inhibidor de la XOD. También se ha demostrado recientemente el efecto protector de alopurinol frente al aumento de CK inducido por el ejercicio físico exhaustivo en humanos (Vina, et al., 2000).

Algunos estudios comienzan a sugerir que la xantina oxidasa podría ser más importante que la mitocondria como fuente de radicales libres producidos por el ejercicio.





*Ilustración 8. Catabolismo de las purinas produciendo una oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico. Generación de Radical Superóxido e inhibición por parte del isómero Alopurinol. Tomado de (Gomez-Cabrera, Domenech, & Vina, 2008)*

### 2.5.1.6. Auto-oxidación de catecolaminas

Cuando realizamos actividad física los niveles en sangre de catecolaminas se ven incrementados considerablemente y aumentan en relación a la intensidad del mismo por lo tanto la auto-oxidación de éstas moléculas puede representar una fuente importante de producción de EROs durante el ejercicio.

### 2.5.1.7. Síntesis de óxido nítrico:

La actividad muscular está relacionada con un incremento en la producción de óxido nítrico y liberación del mismo tanto en el tejido (Balon & Nadler, 1994) como en plasma (Jungersen, Wall, & Wennmalm, 1996). Así mismo hay que aclarar que el óxido nítrico (NO) se considera por definición un radical, ya que posee un electrón desapareado en su último orbital. Una de las especies reactivas del oxígeno con una vida relativamente larga, es el anión peroxinitrito ( $ONO_2$ ) derivada de la reacción del NO con el anión superóxido; de esta forma se piensa que el NO puede intensificar la toxicidad del anión superóxido (Frandsen, Lopez Figueroa, & Hellsten, 1996).

#### **2.5.1.8. Reacciones catalizadas por metales:**

En determinadas condiciones fisiológicas como descensos de pH por debajo de 6, hemólisis o isquemia-reperfusión provocan la liberación de metales de transición como el cobre y el hierro, que pueden incrementar la toxicidad de EROs mediante diferentes reacciones. En presencia del hierro, el peróxido de hidrógeno se convierte por medio de la reacción Fenton (1894) en una molécula más agresiva, el radical hidroxilo. Los iones cobre que catalizan la reacción de Haber-Weiss, también pueden incidir en el incremento de radicales libres.

#### **2.5.1.9. Otros factores que influyen en la formación de radicales libres:**

Agentes externos como radiaciones ionizantes, tabaco, los pesticidas o ciertos fármacos como el paracetamol, favorecen la aparición de radicales libres (Breton Lesmes, Cambolor Alvarez, de la Cuerda Compes, & Garcia Peris, 2000).

### **2.5.2. Daños producidos por el estrés oxidativo: peroxidación lipídica, oxidación de proteínas carbohidratos y ADN.**

#### **2.5.2.1. Peroxidación Lipídica.**

La peroxidación lipídica da lugar a la alteración estructural y funcional de la membrana celular a través de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados que la componen y con la consiguiente formación de hidroperóxidos (ROOH) (Halliwell & Chirico, 1993). La peroxidación lipídica fue definida también como un proceso degenerativo que ocurre en condiciones de estrés oxidativo, dañando las membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen fosfolípidos insaturados, gluco-lípidos y colesterol, (Fernández, Silva-Grigoletto, & Túnez-Fiñana, 2009)

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

Es necesario distinguir entre dos fenómenos distintos: la peroxidación enzimática, por un lado, implicada en el metabolismo de las prostaglandinas, la trombosis, leucocitos y oxisteroles y la peroxidación lipídica no enzimática que tiene lugar en sistemas de membrana de la célula, cuando los RL atacan los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos que la forman, llevando a la ruptura de los mismos y una consecuente formación de una gama de productos oxidativos primarios como, dienos conjugados, hidroperóxidos lipídicos y secundarios como productos de oxidación incluyendo MDA (malonildialdehídos), F2- isoprostano o pentanos, etanos o hexanos expirados, etc.

La peroxidación lipídica tiene lugar en tres fases: iniciación, propagación y terminación (Cheeseman & Slater, 1993), (Ilustración 9). Esto significa que un único evento de iniciación puede desencadenar una amplia reacción de peroxidación lipídica hasta que se agote la disponibilidad de oxígeno y/o de ácidos grasos poliinsaturados no oxidados (Galván, et al., 2008).

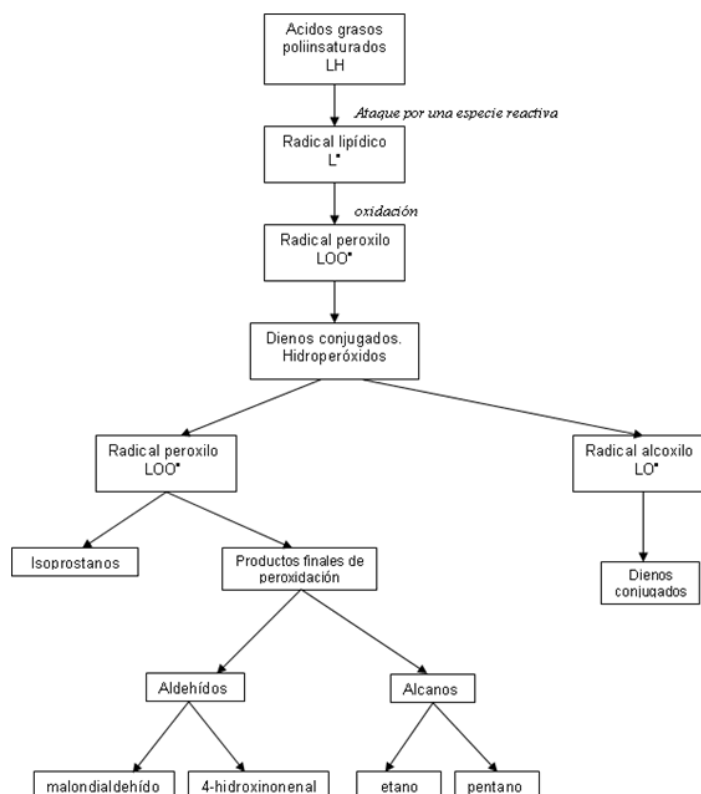


Ilustración 9. Esquema de las fases de la peroxidación lipídica. Tomado de Céspedes, E; y Castillo, J (2008).

La peroxidación se inicia con un ataque de un RL a un ácido graso por la eliminación de un átomo de hidrógeno de una cadena de ácido de metileno.

El hidrógeno tiene un átomo de electrones y por lo tanto es un objetivo preferido de los radicales libres, especialmente cuando la presencia de más dobles enlaces en el ácido permite estabilizar la grasa debido a la reubicación de la electrónica y, a continuación, a la energía resultante de la formación de uno conjugado. El número de dobles enlaces en la cadena de un ácido graso es un factor que aumenta la susceptibilidad a la peroxidación lipídica.

El daño de la peroxidación lipídica influye directamente sobre la membrana de la célula, ya que afecta a la integridad, la fluidez y la permeabilidad de la misma, e indirectamente, ya que puede afectar el ADN y otras moléculas biológicas a través de las reacciones en cadena y los productos procedentes de ellos (Cheeseman & Slater, 1993). Los peróxidos e hidroperóxidos son los principales productos y pueden formar peróxidos cíclicos que a su vez se descomponen a  $\beta$  escisión altamente citotóxicos en compuestos como aldehídos y radical alcoxil (Cheeseman & Slater, 1993). Estos pueden difundirse a través de membranas de lípidos y dañar a células vecinas (Halliwell, 1999). La fluidez es un factor biofísico fundamental para el funcionamiento de las membranas biológicas, y está determinada por el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados que componen la doble capa de fosfolípidos. Un aumento de la fosforilación de lípidos crea una reducción en el flujo mediante la reducción de la resistencia eléctrica. Esto, a su vez, provoca una disminución en la movilidad de las proteínas de membrana y se pone en peligro la función de los canales iónicos, receptores y los complejos de enzimas y transportadores de moléculas (Cheeseman & Slater, 1993).

#### ***2.5.2.2. Oxidación De Las Proteínas Celulares.***

Las proteínas también son sensibles a los oxidantes de EROs y ERON, causando la oxidación en los aminoácidos integrantes de las proteínas, lo que conlleva a la pérdida de la función proteica y/o función enzimática. Se calcula que pueden ser dianas con el 50-75% de los ERON generados (Fisher Wellman & Bloomer, 2009). En particular, han atacado a algunos aminoácidos aromáticos, cisteína y residuos de sulfuro. En términos funcionales, esto se traduce en cambios en la conformación de muchas proteínas extra-celulares (IgG, albúmina, colágeno) y membrana (citocromo oxidasa,  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATP-asa y  $\text{Ca}^{++}$  ATP-asa). Por ejemplo, cuando alguna ERO ataca a la ATP-asa

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  se produce deterioro de la homeostasis del  $\text{Ca}^{++}$  y la conexión intracelular. La rotura del ADN y el ARN, a través de la activación de la proteasa y  $\text{Ca}^{++}$  nucleasa, también se ve perjudicada (Orrenius, McConkey, Bellomo, & Nicotera, 1989). La bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  y la enzima ATP-asa pueden sufrir un grave daño funcional ya que regula el potencial de membrana e indirectamente el  $\text{Ca}^{++}$  intracelular.

El calcio parece que participan en los mecanismos de control de la muerte de la célula y las mitocondrias juegan un papel muy importante en este proceso, ya que actúan como compartimientos de reserva de estos cationes modulando la respuesta inmediata a un cambio en  $\text{Ca}^{++}$  intracelular. Un aumento del flujo de calcio hacia el interior de la mitocondria, si es utilizado adecuadamente, se traduce en una mayor actividad de la CTE y el aumento de la producción de ATP. Por el contrario, un incremento exacerbado conllevaría a la inhibición de la del CTE y a la apertura de un complejo enzimático regulador de la permeabilidad; este complejo está situado transversalmente en la membrana mitocondrial, vinculando la matriz y el citosol, y media el transporte de iones y metabolitos que participan en la respiración celular. Su apertura provoca una reducción del potencial de acción mitocondrial, que conlleva el bloqueo de la fosforilación oxidativa y, por último, la necrosis celular (White & Reynolds, 1996).

La vulnerabilidad y el grado de alteración de los aminoácidos y las proteínas causado por el estrés oxidativo va a depender de muchos factores como la naturaleza y localización relativa de la fuente oxidativa, la proximidad de del radical oxidante a las proteínas, y de la naturaleza y concentración de enzimas y compuestos antioxidantes disponibles. Las proteínas pueden ser oxidadas durante situaciones proinflamatorias, ejercicio físico o isquemia-reperfusión (Finaud, et al., 2006; Fisher Wellman & Bloomer, 2009; Galván, et al., 2008).

Ciertos componentes aminoácidos de las proteínas (histidina, arginina, lisina y prolina) son muy sensibles a la oxidación catalizada por metales formando grupos carbonilos en las cadenas laterales de las proteínas (Tabla 3);

El contenido de proteínas carboniladas generadas por la ruptura y oxidación de la cadena polipéptida principal o por la oxidación de las cadenas laterales en los aminoácidos nombrados anteriormente, es utilizado como marcador de estrés oxidativo. El ejercicio intenso y prolongado puede también inducir la formación de grupos carbonilo.

*Tabla 3. Principales aminoácidos diana de EROS. Productos de oxidación de los aminoácidos.*

<b>Aminoácidos</b>	<b>Productos de oxidación</b>
Cisteína	Disulfuros (-S-S-), ácido cistéico (reversible)
Metionina	Metionina sulfóxido y sulfona (reversible)
Triptófano	OH- triptófano (2,4,5,6,7), nitrotriptófano, quinurenina, 3- OH quinurenina y formil quinurenina.
Fenilalanina	Hidroxifenilalanina (2,3,4) y 2,3 - dihidroxifenilalanina
Tirosina	3,4-Dihidroxifenilalanina, tir-tir-tir- O- tir, entrecruzamientos con nitrotirosina.
Histidina	2- Oxohistidina, aspargina, ácido aspártico
Arginina	Semialdehido glutámico
Lisina	Semialdehido $\alpha$ -aminoalifático
Prolina	2-pirrodilona, 4 y 5 OH -prolina, ácido piroglutámico, semialdehido glutámico
Treonina	Ácido 2-amino-3-cetobutírico
Glutamilo	Ácido oxálico, ácido pirúvico

La disminución de los valores normales de contenido de grupos carbonilos del músculo esquelético indicarían que el proceso antioxidante funciona adecuadamente, y que existe evidencia de que el entrenamiento físico llevado a cabo aumenta las defensas antioxidantes. Por el contrario un aumento en las tasas de grupos carbonilos nos reflejaría que existe un daño oxidativo a nivel del ADN de las células musculares, producido por un mal

funcionamiento del mecanismo antioxidante o por un entrenamiento demasiado intenso y prolongado.

### *2.5.2.3. Oxidación De Carbohidratos.*

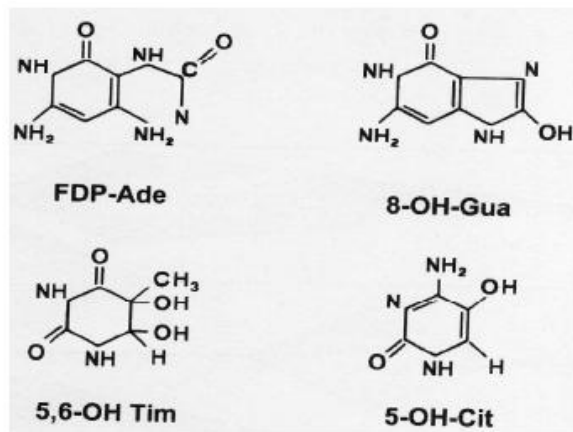
Azúcares como la glucosa, manosa y todos desoxiazucars libres se oxidan para producir  $H_2O_2$  continuamente. El oxialdehido producto de la autoxidación de monosacáridos, está implicado en procesos patológicos de la diabetes, el cáncer, las cataratas y enfermedades crónicas asociadas con el consumo de tabaco (Dunlop & Muggli, 2000).

Las EROs también son la causa de la fragmentación de polímeros de carbohidratos tales como el ácido hialurónico, cuya función es mantener la viscosidad del líquido sinovial. Estas despolimerizaciones están relacionadas también con los procesos de la artritis reumatoide (Greenwal & Schwartz, 1974)  
Oxidación Del ADN.

Se sabe que las EROs pueden causar la rotura de los filamentos de ADN y problemas en el proceso de reparación de los daños de las bases. (Finaud, et al., 2006). Cada parte del ADN es susceptible del ataque de EROs y su sistema de reparación es continuo, aunque esta actividad reparadora puede ser demasiado dañada. Desde un punto de vista químico, los daños del ADN por EROS producen un aumento del número de mutaciones, entrecruzamientos, roturas en las cromátidas o pérdidas de fragmentos cromosómicos, dando lugar a la fragmentación y modificaciones oxidativas en las bases púricas y pirimídicas (Galván, et al., 2008). En el primer caso, puede existir la fragmentación del azúcar, la pérdida de la base y la ruptura de la cadena. En el segundo caso se pueden producir cambios en los nucleótidos (Demple, 1991). Esto contribuiría en la aparición de algunos tipos de cáncer, acelerando el envejecimiento celular

El radical hidroxilo reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN citados anteriormente; la agresión de este radical da a lugar a unos productos tales como (FDP-Ade) 5-formamido-4,6 diamino pirimidina; (8-OH-Gua) 8-hidroxi guanina, (5,6-OH-Tim) timina glicol y (5-OH-Cit) 5,6 dihidroxi citosina, (Ilustración 10) que pueden ser analizados en el deportista para

identificar el daño sufrido en el ADN celular post ejercicio; actualmente existen varios estudios que utilizan como marcador de daño oxidativo del ADN, la detección de la concentración de 8-hidroxiguanina, ya que es una molécula fácil de detectar en orina.



*Ilustración 10. Productos finales de la agresión al ADN por EROS. Tomado de Casado, A y col; (2006).*

Ésta molécula está relacionada con la pérdida de la funcionalidad de la mitocondria debido a que el ataque de las EROs puede llegar a producir mutaciones en el ADN mitocondrial, dado que reduce la fidelidad de replicación de la enzima ADN polimerasa ante esta base. Como resultado, la oxidación del ADN puede causar mutagénesis. Estas mutaciones generan proteínas con modificaciones en su función enzimática y que no son tan eficientes en las reacciones de respiración y aumentan la cantidad de especies reactivas las cuales evidentemente pueden reaccionar con el ADN mitocondrial y repetir el ciclo el cual eventualmente conlleva al envejecimiento y la pérdida de función celular de la mitocondria. (Brieba et al., 2007). Otras causas de daño oxidativo al ADN, con efectos mucho mayores, fueron encontrados en la inflamación crónica de la célula con pérdida de la mitocondria; esto último aumentaba con la práctica deportiva.

### 2.5.3. Daño de origen muscular.

Actualmente es ampliamente conocido que el ejercicio físico intenso y/o moderado y/o de larga duración y sobre todo de carácter excéntrico, genera daño muscular. Los estudios realizados hasta el momento sugieren que los



## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

efectos inmediatos asociados a la lesión muscular son de tipo mecánico, y se originan fundamentalmente por la tensión soportada por el sarcómero de la fibra muscular (Lieber & Friden, 1999), la cuál termina por una hidrólisis de las proteínas estructurales de la miofibrilla y por consiguiente con una deestructuración de la misma. Posteriormente aparece el fenómeno de la inflamación, la cual ayuda a degradar y reparar el tejido. Durante la respuesta aguda del organismo al entrenamiento, los mecanismos celulares periféricos se implican primordialmente en aportar el suministro de energía, e involucran a las reacciones asociadas a la producción de citoquinas y de hormonas orientadas al proceso de reparación. A esta clase de lesiones se las conoce como microtraumas adaptativos y suelen ser producidas en el músculo por las contracciones excéntricas y concéntricas; y en el sistema articular, por los elevados volúmenes de trabajo en las que se haya implicado. Son lesiones presentes habitualmente en el proceso de supercompensación del entrenamiento y que están dirigidas en definitiva y en principio a la mejora del rendimiento deportivo. Por este motivo se les aplica el calificativo de adaptativas, entendiéndolas como un proceso inflamatorio, cuyo destino final no es otro, que la curación del microtrauma (Bigard, Merino, Lienhard, Serrurier, & Guezennec, 1997). No obstante, actualmente existe una tendencia que apoya que las alteraciones sucesivas y acumulativas del metabolismo muscular pueden ser el inicio del Síndrome de Sobreentrenamiento (SSE) y por ello, éste a su vez se relaciona, según varios autores, con el daño muscular.

En el ámbito deportivo, la determinación de creatinquinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH), son las técnicas más usadas para detectar el SSE, pero a su vez presentan graves problemas de rapidez y fiabilidad en el diagnóstico y detección de las proteínas contráctiles (Clarkson, Byrneswc, McCormick, & White, 1986). La actividad enzimática de CK en suero o la concentración de MDA en plasma pueden no aumentar durante el sobreentrenamiento y cambios en estos parámetros bioquímicos pueden reflejar sólo una sobrecarga muscular (Komulainen *et al.*, 1995).

En nuestro estudio hemos querido tener presente la posibilidad de daño de origen muscular producido por el estrés oxidativo inducido por la práctica

deportiva y en relación al envejecimiento. Para ellos hemos estudiado la concentración sérica de  $\alpha$ -actina. Esta proteína, es un homodímero con subunidades y de 95-100 kDa de peso molecular, que juega un papel decisivo en el proceso de contracción de la célula muscular cardíaca (Pelouch, 1995). Fue inicialmente descrita en músculo esquelético (Ebashi & Ebashi, 1965) y presenta diferentes isoformas las cuales se diferencian por su sensibilidad al calcio (Senger & Goldman, 1995) y por su localización estructural. En el músculo esquelético esta proteína forma parte de las bandas Z donde interacciona con la actina (Heng, Yasunaga, & Wakabayashi, 1995) actuando como punto de anclaje para la preformación de filamentos delgados. La modificación de su expresión a lo largo de la maduración de la célula muscular tiene importantes implicaciones en la función contráctil de este tipo de células (Pelouch, 1995).

Existen hipótesis que relacionan el daño muscular con el origen metabólico. Una de ellas defiende un fallo de los procesos oxidativos en la síntesis del ATP. El ejercicio de larga duración, se traduce al final en una alteración de la función mitocondrial, que tendría como consecuencia un fallo en las bombas iónicas ATP-dependientes del retículo sarcoplasmático, y un defecto de la salida del calcio de la célula. La subida de los niveles del calcio intracelular, sería la causa de las lesiones estructurales, probablemente por la activación de proteasas del calcio-dependientes (Belcastro, Shewchuk, & Raj, 1998). Sin embargo y en contra de esta hipótesis aparece el hecho de que las lesiones musculares más representativas y estudiadas ocurren en ejercicios de contracción excéntrica donde el gasto de energía celular es muy bajo (Snow, 1977).

Otra hipótesis se vincula a la situación de estrés oxidativo generada por el ejercicio de larga duración y/o alta intensidad. En este contexto las defensas primarias antioxidantes (enzimas) pueden verse desbordadas y provocar que las EROs ataquen a las membranas lipídicas de las estructuras celulares mediante el proceso de peroxidación lipídica, influyendo en la permeabilidad de las mismas y rompiendo la homeostasis iónica intracelular, lo que favorecerá especialmente a un aumento del calcio intracelular y la consiguiente activación

del sistema de proteasas cálcico-dependientes. Hasta hoy en día y debido a las dificultades de estudio, esta hipótesis no se ha confirmado.

Se estudió también que una alteración en la microcirculación podía ser la causa de lesiones musculares. Siendo claramente demostrado que las lesiones de la red capilar eran secundarias a las alteraciones de las miofibrillas (Peeze-Binkhorst, Kuipers, Tangelder G.J, Slaaf, & Reneman, 1989), no podemos relacionar esta tesis con la causa principal de las lesiones de origen muscular si no únicamente con el aumento de la temperatura del músculo (R. B. Armstrong, Warren, & Warren, 1991)

Ante la falta de marcadores específicos y fehacientes de daño muscular, se comenzó a estudiar la alfa-actina. La actina es una de las dos proteínas que más abundan en el músculo y puede llegar a representar el 20% total de proteínas celulares (A. Aránega et al., 1991). Primeramente se demostró en músculo cardíaco, que la alfa-actina se detecta en el suero de pacientes con Angina Inestable (A.E. Aránega et al., 1992), y que es sensible para demostrar pequeños niveles de lesión miocárdica (Prados *et al.*, 1995) en pacientes sin IAM mostrando indicios muy parecidos a los estudiados en la Troponina T; al igual que podría utilizarse como marcador de pronóstico de Angina Inestable (A.E. Aránega et al., 1993). Seguidamente se estudió la posibilidad de utilizar alfa actina como marcador específico de daño muscular al tratarse de una proteína específica del sarcómero y conocer su importancia en la contracción muscular (Martínez-Amat et al., 2005). Una vez se determinó como buen indicador de daño muscular, fue demostrada su fiabilidad en deportistas, en un estudio donde se compararon deportistas con daño muscular frente a deportistas sin daño muscular, con el objetivo de hallar un marcador tanto más específico y exacto, como con una medida más rápida, para poder actuar con mayor brevedad frente a las lesiones de los deportistas de élite. Por lo tanto, actualmente es sabido que concentraciones elevadas de alfa-actina en suero puede expresar daño de carácter sarcomérico o cardíaco, y que en nuestro caso podría deberse al estrés metabólico y/o mecánico generado según el volumen- intensidad de práctica deportiva realizada a lo largo de la vida.

## 2.6. Sistema de defensa antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que ayudan reducir los efectos negativos del estrés oxidativo, bien por la formación de un radical menos activo o por frenar la cadena de interacciones de RL sobre sustratos como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ADN (Finaud, et al., 2006). El antioxidante tiene la capacidad de ceder un electrón de hidrogeno a un radical libre para dejarlo estable, sin transformarse en moléculas inestables.

Todas las células aeróbicas están sujetas a estrés oxidativo. El organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática, diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres. Halliwell en 1995 definió antioxidante como "cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato". Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previendo la formación de ROS.
- Interceptando el ataque de ROS.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Estos sistemas de defensa antioxidantes pueden bloquear las reacciones en cadena de EROs o desviarlas a reacciones menos nocivas para el organismo (Sies & Cadenas, 1985). Otra definición de los antioxidantes según (Galván, et al., 2008) es, cualquier sustancia que a bajas concentraciones y en presencia de un sustrato oxidable, retrasa y/o previene la oxidación del mismo, inhibiendo la tasa de oxidación. Un antioxidante es también conocido como "cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el

daño oxidativo provocado en una molécula diana” (Gutteridge & Halliwell, 2010; Halliwell, 2007).

Nuestro sistema de defensa antioxidante está formado principalmente por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (tabla 4); los cuales trabajan en conjunto y de forma organizada en diferentes sitios (fibras musculares, orgánulos, mitocondria, espacios extracelular y vascular, etc.) con el objetivo de proteger la célula del daño oxidativo durante el aumento de producción de EROs. Para esto, utilizan diferentes estrategias como: convertir los EROs en moléculas menos reactivas y evitar que se transformen en formas más perjudiciales, y minimizando la disponibilidad de pro-oxidantes como hierro y cobre (Powers y Jackson, 2008).

Según su estructura molecular, los antioxidantes se clasifican en enzimáticos y en no enzimáticos. El control enzimático se produce por la acción de las enzimas dependientes de iones y metales (Cu, Mn, Se y Zn) como son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR) y se encuentran activos en nuestro organismo (antioxidantes endógenos). El control antioxidante no enzimático incluye a antioxidantes como el glutatión, ácido ascórbico (Vitamina C) retinol (Vitamina A) y ácido úrico como compuestos hidrosolubles y tocoferol (Vitamina E) y los carotenos como liposolubles; además de éstos poseemos otras moléculas como flavonoides, tioles, ubiquinona, bilirrubina, ferritina y micronutrientes (hierro, cobre, zinc, selenio, manganeso), que actúan como cofactores de enzimas. Los antioxidantes no enzimáticos están la mayoría, presentes en los alimentos comunes (antioxidantes exógenos). Dicho así podemos diferenciar entre antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Todos estos antioxidantes pueden ser también de origen intracelular o extracelular (tabla 4).

Tabla 4. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos modificados de Powers y col., (1999).

<b>Antioxidantes Enzimáticos</b>	<b>Ubicación celular</b>	<b>Propiedades antioxidantes</b>
Mn superóxido Dismutasa	Mitocondria	Dismutasa radicales peróxido
Cu-Zn superóxido Dismutasa	Citosol	Dismutasa radicales superóxido
GHS peroxidasa	Citosol y mitocondria	Descompone H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e hidroperóxidos orgánicos
Catalasa	Citosol y mitocondria	Descompone H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Antioxidantes no enzimáticos</b>	<b>Ubicación celular</b>	<b>Propiedades antioxidantes</b>
Vitamina E	Compuestos fenólicos solubles en lípidos; localizada en membranas	Principal antioxidante que irrumpe la cadena de peroxidación lipídica
Vitamina ce (ác. Ascórbico)	Soluble en agua; localizado en citosol	Regenera una amplia variedad de EROs en fase acuosa; regenera
GSH	Citosol y mitocondria	
Ácido lipóico	Tiol endógeno. Localizado tanto en la fase acuosa como en la lipídica	Interviene en el reciclado de Vitamina C. puede ser sustituto de GSH
Ubiquinonas	Derivados de quinona solubles en lípidos; localizadas en la membrana	Las formas reducidas son antioxidantes eficientes
Carotenoides	Solubles en lípidos; localizados principalmente en membranas	Antioxidantes; reducen la peroxidación lipídica

El sistema antioxidante fue desarrollado para defender el cuerpo contra los radicales libres, disponiendo de varios mecanismos como (tabla 5):

- Los mecanismos de prevención.
- Los mecanismos de intercepción: que interrumpen la cadena de reacciones de peroxidación lipídica.
- Los mecanismos de reparación de daño oxidativo.
- Los mecanismos de adaptación.

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

Tabla 5. Esquema de antioxidantes según origen, localización y mecanismo de acción. Tomada de modificada de Ferreira y col; (2007).

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

Diferentes autores (Gutteridge & Halliwell, 2010; Rusanova et al., 2010) también clasifican a los antioxidantes según el mecanismo de acción (tabla 6) en:

- Defensas primarias: que previenen la formación de Radicales Libres.
- Defensas secundarias: que inactivan o “barren” los Radicales Libres ya formados.
- Defensas terciarias: que retiran o reparan el daño oxidativo, principalmente el del ADN.

Tabla 6. Clasificación de los sistemas antioxidantes según el grado de defensa. Tomado de Rusanova, y col., (2010).

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.
Glutation peroxidasa	Glutation	Enzimas Reparadoras de ADN (ensonucleasas, exonucleasas)
Glutation reductasa	Melatonina	Metionina
Glutation S- transferasa	Vitamina E	Sulfóxido reductasa
Catalasa	Vitamina C	
Superóxido Dismutasa	B- Caroteno	
	Ácido úrico	
	Estrógenos	
(Rusanova, 2010)		

Las siguientes tablas 7 y 8 muestran diferentes clasificaciones de los principales antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en función de su localización celular y su radical diana u objetivo.

Tabla 7. Clasificación de los principales antioxidante en función de su tipología y localización. Tomado de Blasco, R; (2009).

Enzimáticos	Enzimas Antioxidantes	Especificidad de sustrato.		Superóxido Dismutasa.	
		Intracelulares.	No suplementables exógenamente.	Catalasa	
No Enzimáticos	Enzimas Antioxidantes	Especificidad de sustrato.	Fase Lipídica	Vitamina A	
			Membranas celulares	Vitamina E	
				Ubiquinol 10/Coenzima Q10	
		No especificidad de sustrato.		Vitamina C	
			Vitamina E		
			Ácido úrico		
		Extracelulares. Suplementables exógenamente	Fase acuosa	Selenio	
			Extracelular	Proteínas Plasmáticas	Grupo sulfidrilo
					Albúmina
	Haptoglónina				
	Proteínas fijadoras de cobre y hierro	Extracelular		Ferritina	
		Extracelular		Transferrina	
		Extracelular (leche materna)		Lactoferrina	
Intracelular (neutrófilos)					
Extracelular		Celuloplasmina			



## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

*Tabla 8. Clasificación general de los antioxidantes no enzimáticos en función de su acción.*

Antioxidantes	Localización	Acción	Objetivos
<b>Antioxidantes directos</b>			
Vitamina E	Lípidos; célula, membrana de la mitocondria	Inhibición de la peroxidación lipídica. Estabilización de la membrana.	ROOH- <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Vitamina A	Lípidos y membranas de las células	Reducción de la peroxidación lipídica	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> - ROOH
Vitamina C	Medio acuoso, citosol y líquido extracelular	Regeneración vitamina E. Protección LDL	OH <sup>-</sup> - O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Glutation	Medio acuoso	Sustrato para GPX. Regeneración vitamina E y C.	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> - OH <sup>-</sup>
Cisteína	Medio Intracelular	Precursor del glutatión.	
Ácido lipóico	Medio acuoso	Inhibición de la peroxidación lipídica. Regeneración vitamina E, C y cisteína	
Tiorredoxina	Medio acuoso	Regeneración vitamina E. Síntesis de Mn- SOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - ROOH
Glutarredoxina	Medio acuoso		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Flavonoides	Unido a glúcidos	Inhibición enzimas antioxidantes. Captura de los iones pro-oxidantes (Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cu <sup>2+</sup> ). Protección LDL	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -OH <sup>-</sup> -ROOH- RO <sup>-</sup>
Conzima Q <sub>10</sub>	Membrana interna de la mitocondria	Regeneración vitamina E y C. Protección LDL.	ROO <sup>-</sup>
Ácido úrico	Medio acuoso	Captura de los iones pro-oxidantes (Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cu <sup>2+</sup> ). Protección de DNA, eritrocitos, hemoglobina y lípidos	OH <sup>-</sup> -ROOH-O <sub>3</sub> <sup>-</sup> HOCL- ONOOH
<b>Antioxidantes indirectos</b>			
HSP	Medio acuoso	Protección de las proteínas	
Hierro	Medio acuoso	Catalasa Cofactor	
Ferritina	Medio acuoso	Captura de iones hierro libres	
Zinc	Medio acuoso	Cofactor de SOD (Mn-Zn- SOD). Protección de LDL y tioles. Inhibición en la producción de radicales libres.	
Cobre	Medio acuoso	Cofactor de SOD (Mn-Zn- SOD).	
Selenio	Medio acuoso	Cofactor GPX	
Manganeso	Medio acuoso	Cofactor de SOD (Mn-SOD).	
Albumina	Medio acuoso	Cede electrones a los radicales libres. Captura de Cu <sup>2+</sup>	
Ceruloplasmina	Medio acuoso	Cede electrones a los radicales libres. Captura de Cu <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> y Fe <sup>3+</sup>	
Bilirrubina	Medio acuoso	Cede electrones a los radicales libres. Inhibición de la peroxidación lipídica. Protección eritrocitos	

La eficiencia del sistema depende de la ingesta de antioxidantes mediante los nutrientes (vitaminas y micronutrientes) y la producción endógena de enzimas antioxidantes, que pueden ser modificados, por el ejercicio, el entrenamiento, la nutrición y el envejecimiento. La funcionalidad del sistema antioxidante es importante en la fisiología deportiva, ya que el ejercicio aumenta la producción de EROs. Tanto los antioxidantes enzimáticos como los no enzimáticos, desempeñan un papel vital en la protección excesiva de los tejidos frente al daño oxidativo.

Las respectivas acciones de antioxidantes y su localización son representadas en la Ilustración 11 y 12, con las referencias bibliográficas más actuales.

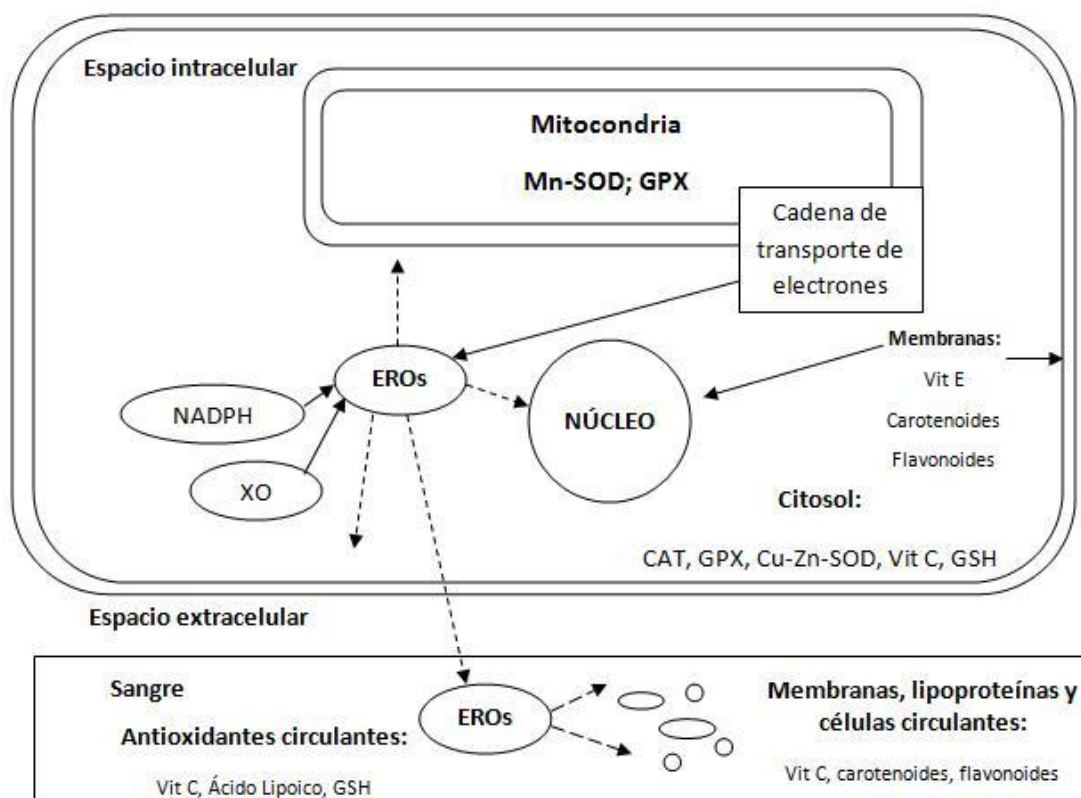


Ilustración 11. Las fuentes potenciales de EROs en el músculo y la localización de las defensas antioxidantes (Finaud, et al., 2006)

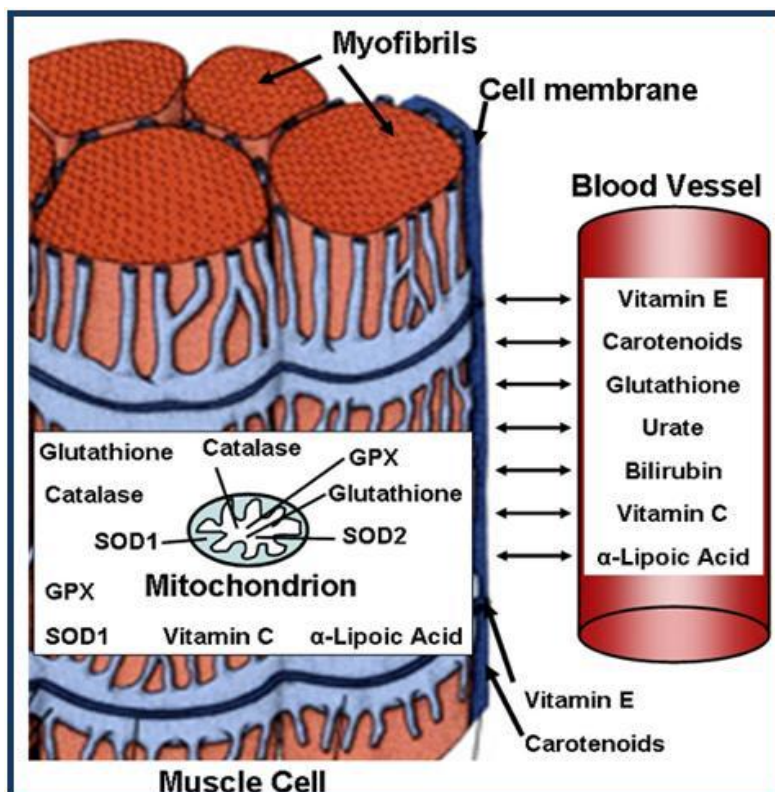


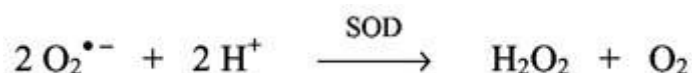
Ilustración 12. Localización específica de la acción de cada antioxidante (enzimático y no enzimático). Tomada de (Powers & Jackson, 2008)

### 2.6.1. Antioxidantes enzimáticos

Son proteínas de bajo peso molecular, que minimizan el daño oxidativo al catalizar las reacciones químicas y eliminar los radicales libres en células y tejidos. Afectan a la unión de factores de transcripción en el ADN y por lo tanto, pueden ser sintetizados por la activación redox de genes específicos, (Berzosa et al., 2011). Existen diversas enzimas antioxidantes como la peroxirredoxina, la glutaredoxina, y la tiorredoxina reductasa que también contribuyen a la protección celular los procesos de oxidación, pero los principales antioxidantes enzimáticos son: Superóxido Dismutasa, Catalasa, Glutathión Peroxidasa y Glutathion Reductasa.

**2.6.1.1. Superóxido Dismutasa (SOD)**

Esta enzima antioxidante fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich constituye la primera línea de defensa ante la generación de radicales superóxidos. Cataliza la reacción de dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Esta reacción puede ocurrir de forma espontánea pero si es catalizada por esta enzima, la velocidad aumenta 10 veces (Casado, Merino, Cid J.Subirá, & Sanchez- Ibarrola, 1996).



Se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos aerobios, jugando un importante papel en el control de los niveles de O<sub>2</sub> en los compartimentos celulares (Monte, 1994).

En humanos existen tres formas de superóxido dismutasa. SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular (tabla 9). Todas exigen una activación redox de los metales de transición en el sitio activo, para su actividad catalítica sobre el anión superóxido. La primera es un dímero (consiste en dos subunidades), mientras que las otras son tetrámeros (cuatro subunidades). SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo. (Powers & Jackson, 2008).

*Tabla 9. Propiedades de los isoformas de la enzima SOD en humanos. Tomado de Powers and Jackson (2008).*

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

La asignación relativa de las isoenzimas de la SOD1 y SOD2 varía en los diferentes tejidos. En el músculo esquelético, del 15-35% de la actividad de la SOD total se encuentra en la mitocondria, y la restante 65-85% se encuentra

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

en el citosol. Las diferentes superóxido dismutasas se encuentran también ampliamente distribuidas por los tejidos, salvo la Mn- SOD que no se localizan en eritrocitos. En humanos las enzimas Cu y Zn. SOD, presentan mayor actividad en el hígado y sustancia blanca del cerebro, y las Mn- SOD, en hígado, corazón y páncreas. Las isoformas extracelulares son más activas en el útero, glándula tiroidea y páncreas. (Monte M y col; 1994).

La actividad total de la SOD en músculo es inferior a la del hígado y riñones, semejante a la del cerebro, corazón y páncreas y superior a la de los eritrocitos. La actividad de SOD en el músculo esquelético no es constante y pueden ser modificadas según el tipo de ejercicio practicado. Algunos estudios sugieren que el ejercicio de resistencia crónico (de semanas a meses) no aumenta la actividad de SOD en el músculo; pero la mayoría de los investigadores concluyen que la práctica de ejercicio de resistencia promueve el aumento de 20 a 112% en la actividad enzimática tanto de la SOD1 como de la SOD2 en los músculos ejercitados. No existe una explicación definitiva a este hecho, pudiendo ser las diferencias metodológicas en el ensayo una de las explicaciones a este paradigma. (Powers y Jackson, 2008). Asimismo, se encuentra descrito en la literatura que la capacidad total de esta enzima varía con las características histoquímicas del musculo-esquelético, siendo los músculos con mayor porcentaje de fibras oxidativas los que poseen más cantidad de esta enzima (Ferreira, Ferreira, & Duarte, 2007 ).

La importancia fisiológica que posee la enzima SOD para la esperanza de vida se evidencia en diversos estudios en ratas modificadas genéticamente que carecen de determinadas isoformas de ésta enzima. Los carentes de SOD2 mueren a los pocos días por estrés masivo (Li, 1995); los desprovistos de la SOD1 desarrollan diversas patologías (pérdida de masa muscular, cataratas, etc) y una corta esperanza de vida (Elchuri et al., 2005). Sin embargo las ratas sin SOD3 muestran una esperanza de vida normal (Sentman et al., 2006).

En humanos, se ha relacionado la esclerosis lateral amiotrófica, con mutaciones en la SOD1 (Banci et al., 2008). La sobreexpresión de SOD1 también se ha relacionado con el Síndrome de Down (Campana et al., 2004).

No se ha encontrado relación de mutaciones de las otras isoformas con enfermedades en humanos a diferencia de los ratones.

Junto a los beneficios que aporta esta enzima, se cree que la superóxido dismutasa es capaz de revertir la fibrosis, posiblemente a través de la reversión de los miofibroblastos de nuevo a fibroblastos (Campana, et al., 2004). La SOD ha sido utilizada para reducir el daño oxidativo mediante inyección directa en sitios de inflamación, demostrando un efecto antiinflamatorio (Winrow, Winyard, Morris, & Blake, 1993). En radioterapia, ha jugado un papel protector en procesos de isquemia-reperfusión, en diferentes patologías y órganos (Monte, M y cols; 1994).

#### 2.6.1.2. *Catalasa (CAT)*

La catalasa fue descrita en 1970 por Deisseroth, y se encuentra presente prácticamente en todas las células animales y plantas. Es una enzima ferriporfirínica e intracelular y se localiza principalmente en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%) (Nieto, 1993). Está constituida por 4 subunidades y un grupo “hemo” enlazado en su centro activo.

Esta enzima posee doble función, una denominada **actividad catalítica** donde cataliza la descomposición del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  y otra denominada **actividad peroxidica** donde actúa en la oxidación de donadores de hidrógeno, como el metanol, etanol, los fenoles, entre otros. Se ha observado que la primera reacción es muy rápida frente a la segunda (Aebi, 1984). El predominio de una actividad sobre la otra es directamente proporcional al número de donadores de hidrógeno o hidroperóxidos que haya en el medio (Aebi, 1984).

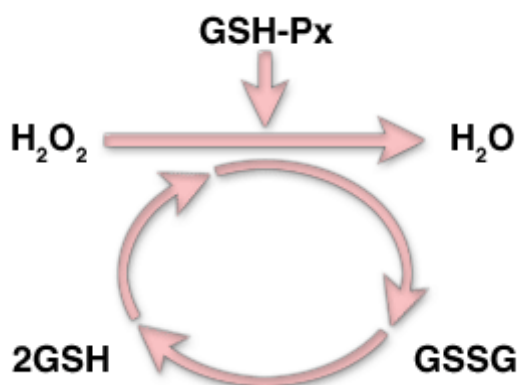
Aunque la catalasa necesite de grandes cantidades de  $H_2O_2$  para su mayor afinidad, se ha descubierto que su actividad también disminuye en concentraciones superiores a 0,1 M; esto es debido a que los complejos que se forman en ambas actividades de la catalasa en el proceso de descomposición de hidroperóxidos y  $H_2O_2$  no se forman activos (Aebi, 1984). Según estudios, la catalasa también se inactiva por anión superóxido (McCord, 1989).

La cantidad de CAT en los tejidos es diferente, siendo muy baja en plasma y muy alta en eritrocitos e hígado (Nieto, 1993). Los niveles de CAT

más altos parecen estar en las fibras con alta capacidad oxidativa (Powers et al., 1994). Actualmente existe controversia entre los estudios que defienden que la expresión de CAT aumenta con el ejercicio crónico (Vicent, Braith, Lennon, & Lowenthal, 2002) frente a los que preservan que desciende o no existen cambios (Powers, et al., 1994). Parece ser que la ambigüedad en estos estudios es debida a la técnica de ensayo usada, ya que se ha demostrado que la actividad de esta enzima depende directamente y no únicamente de la cantidad de la misma, sino de la cantidad de sustrato, es decir, de  $H_2O_2$  (L.L. Ji, 1995).

### 2.6.1.3. *Glutation Peroxidasa (GPx)*

La glutatión peroxidasa es una enzima antioxidante encargada de la reducción de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos (ROOH) a agua y alcohol. Para ello usa el glutatión reducido (GSH) formando glutatión disulfuro oxidado (GSSG) (Ilustración 13).



*Ilustración 13. Ciclo de actuación de la GPx.*

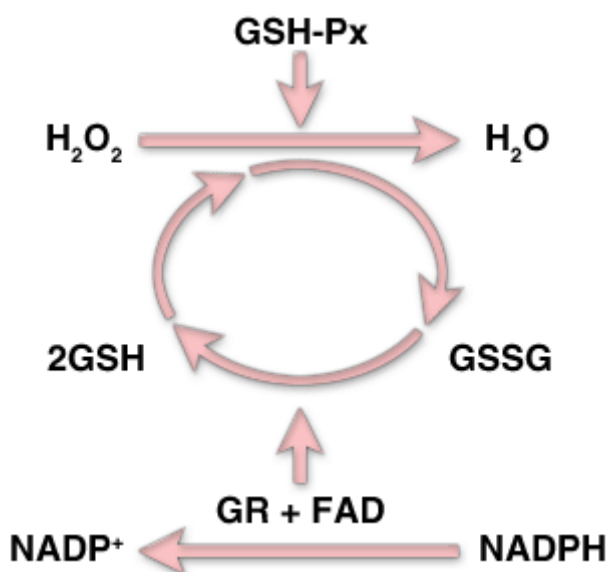
La actividad de esta enzima se encuentra estrechamente relacionada con la presencia de Selenio, el cual usa como cofactor. Se localiza en las mitocondrias y en el citosol, aproximadamente en un 55% y 45% respectivamente, del músculo esquelético. Debido a la escasez de CAT en las mitocondrias, la glutatión peroxidasa constituye la segunda línea de ataque de las ERO's tras la acción de la SOD.

En seres vertebrados se conocen al menos 4 formas de GPx: una forma citosólica (GPx1), una forma gastrointestinal (GPx-GI), una forma secretada en el plasma (GPx-P) y una forma epididimial secretada (GPx-EP).

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

#### 2.6.1.4. *Glutathion Reductasa (GR)*

La enzima encargada de catalizar la reacción de reducción del glutatión disulfuro o glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH), se denomina Glutatión reductasa. Es una flavoproteína dependiente del NADPH. Esta reacción es esencial para mantener los niveles de GSH en el citosol de la célula y para que el GSH pueda ser utilizado por la GPx en la eliminación del  $H_2O_2$  (Ilustración 14).



*Ilustración 14. Intervención de la enzima GR en el ciclo del glutatión y la actividad de la enzima GPx.*

Mantener los ratios de GSH, no es su única función, ya que el GSH es de utilidad también para, como comentamos anteriormente, la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol) luego de participar en la eliminación de RL generados in situ o a distancia. El GSH interviene además



en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular.

Por tanto, la alteración de la actividad de la GR provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de EROs. La alteración de la actividad de la GR y de los niveles de GSH, está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo afectando al funcionamiento de varias de las enzimas y sustancias antioxidantes endógenas (Ilustración 15) reportándose en varios procesos patológicos como son: cáncer, diabetes mellitus, obesidad y enfermedad del Parkinson.

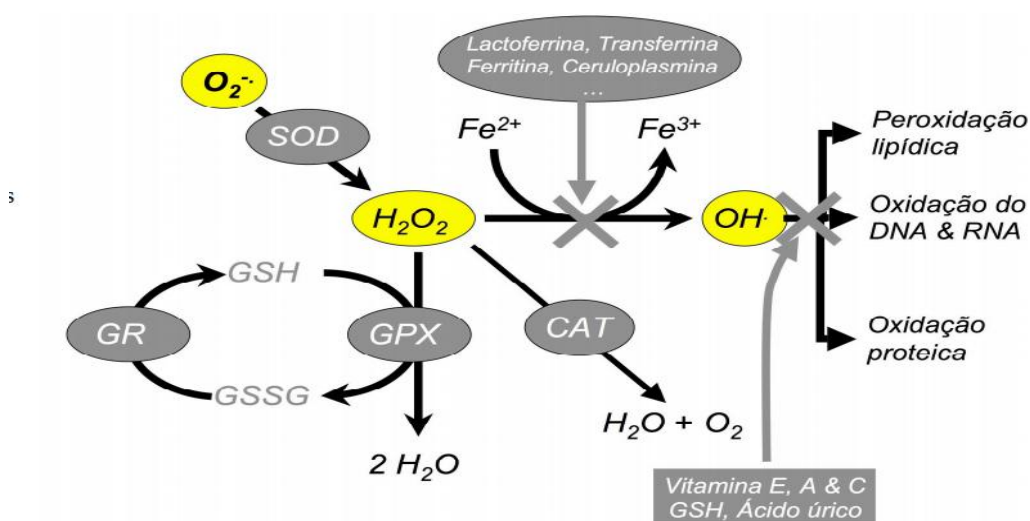


Ilustración 15. Acción de los antioxidantes en los radicales libres. SOD-Superóxido Dismutasa; GR- Glutation Reductasa; GSH y GSSG- Formas reducidas y oxidada del glutatión; CAT- Catalasa; ADN-Ácido desoxirribonucleico; ARN- Ácido Ribonucleico. Tomada de Ferreira y col., (2007)

### 2.6.2. Antioxidantes no enzimáticos.

Además del sistema antioxidante enzimático, nuestro organismo, posee una serie de sustancias no enzimáticas que disfrutan de cualidades antioxidantes y actúan también frente a las ERO's. Se dividen en dos tipos de sustancias, las denominadas lipofílicas, tales como las vitaminas E,  $\beta$ -

caroteno, ubiquinona y ubiquinol y flavonoides; y las hidrofílicas como vitamina C, y GSH.

#### *2.6.2.1. GSH – Glutation Reducido*

El (GSH) es un tripéptido formado por los tres aminoácidos: glicina, glutamato y cisteína. Es el principal tiol no proteico que se encuentran en las células, se sintetiza en el citosol en dos pasos que requieren ATP. Actualmente, se considera el principal antioxidante endógeno de carácter no enzimático, muy importante en el proceso de defensa antioxidante de la fibra muscular o miocito, y que por lo tanto es de gran interés durante la actividad física.

Varios estudios muestran que el contenido muscular de GSH se incrementa en respuesta a la práctica regular de ejercicios de resistencia a alta intensidad (>80% VO<sub>2</sub>max) (Fernández, et al., 2009).

Hoy en día, son ampliamente aceptadas, las diversas funciones del glutati6n reducido (GSH), actuando adem6s de como agente reductor y un antioxidante celular, como un mediador de diferentes reacciones fisiol6gicas, incluido el metabolismo de xenobi6ticos, reacciones tiol de intercambio de disulfuro, y la se6alizacion celular (c6lulas regulaci6n del ciclo, la proliferaci6n y la apoptosis). El GSH es esencial en la regulaci6n de los puentes disulfuro de las prote6nas y en la eliminaci6n de electr6filos y oxidantes, (Lee, Hammond, & Ballatori, 2001). As6, la funci6n antioxidante de GSH est6 mediada por la actividad de este grupo tiol-redox que oxida al GSH y 6ste reduce a las mol6culas diana.

El glutati6n oxidado (GSSG) se acumula dentro de las c6lulas; la relaci6n de GSH a GSSG es una buena medida del estr6s oxidativo. El par redox, GSH / GSSG pueden f6cilmente interactuar con la mayor6a de las parejas redox relevantes fisiol6gicamente, sometidos a la oxidaci6n reversible o reacciones de reducci6n, manteniendo as6 el equilibrio redox en la c6lula (Mari, Morales, Colell, Garcia-Ruiz, & Fernandez-Checa, 2009).

El GSH se distribuye en los siguientes org6nulos intracelulares (Ilustraci6n 16):

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

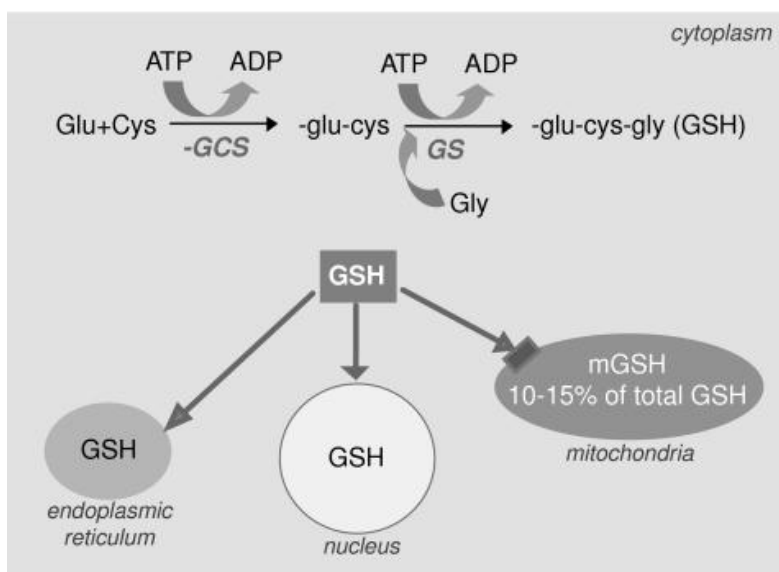


Ilustración 16. Distribución celular del GSH. Tomado de Mari y col., (2009).

- Núcleo: mantiene las proteínas sulfhídricas, que son necesarias para la reparación y expresión del ADN (Valko et al., 2007) y también funciona como un donante de hidrógeno en la ribonucleótido reductasa catalizada por la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos y por lo tanto juega un papel importante en la síntesis de ADN (Holmgren, 1977).
- RE: manifestado en GSSG, es la principal fuente de oxidantes y es necesario para proporcionar el ambiente adecuado para favorecer la formación de enlaces disulfuro y el nacimiento de proteínas (Hwang, Sinskey, & Lodish, 1992)
- Mitocondria: según (Mari, et al., 2009) la concentración de GSH mitocondrial (mGSH) es similar a la del citosol (10-14 mM), pero aun así, las mitocondrias deben garantizar un equilibrio entre la actividad de MnSOD y el ciclo redox GSH para gestionar el peróxido de hidrógeno de manera eficiente (Mari, et al., 2009) debido a la exclusiva síntesis del GSH en el citosol. La importancia y a la vez dificultad que presenta el GSH dentro de la matriz mitocondrial es que a diferencia de en el citosol, las mitocondrias no contienen la maquinaria enzimática para la síntesis de GSH de sus aminoácidos constituyentes (Griffith & Meister, 1985)

- En todo caso el GSH no tiene problemas para atravesar la membrana externa de las mitocondrias pero necesita de ayuda para traspasar la membrana interna mitocondrial.

#### 2.6.2.2. *Vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol)*

Vitamina liposoluble que actúa como antioxidante, protegiendo el tejido corporal del daño causado por las EROs; de hecho ha sido demostrado que la deficiencia de vitamina E aumenta el estrés oxidativo y la fatiga (Finaud, et al., 2006). La vitamina E, es considerada el antioxidante de membrana más eficaz jugando grandes papeles de protección en nuestro organismo como por ejemplo: es esencial en el sistema inmunitario, es importante en la formación de glóbulos rojos e interviene en el uso de la vitamina K, así como en el proceso de dilatación de vasos sanguíneos para evitar coágulos.

Existen al menos 8 formas isoméricas de las cuales, el  $\alpha$ - tocoferol es la más funcional y predominante en distintas especies; Es la más activa biológicamente y mejor antioxidante liposoluble en células de mamíferos y en sangre (Burton, 1982). 'Interviene de diferentes modos: Interacciona con numerosos antioxidantes como: vitamina C, GSH,  $\beta$  caroteno o ácido lipoico; activa la reducción del citocromo C; y reduce el NADH (todavía no está claro su metabolismo en la cadena respiratoria); disminuye la fluidez de la membrana, altera la permeabilidad al fosfato y adicionalmente puede afectar al metabolismo de AMPc, previniendo la peroxidación del ácido araquidónico a prostaglandinas (Galván, et al., 2008).

El mecanismo de inhibición de la oxidación especialmente en lípidos por  $\alpha$ - Tocoferol, ha sido muy estudiado in vitro. Parece ser que es a nivel del radical lipídico peroxilo de la cadena de peroxidación lipídica donde la vitamina E actúa eliminándolo y evitando que siga la propagación de formación de radicales libres (Witing, 1980). Se conoce que el  $\alpha$ - Tocoferol, atrapa al radical peroxilo 10 veces más rápido de lo que éste reacciona con otro lípido, es decir, el 90% de radicales peroxilo son interceptados y eliminados por el  $\alpha$ - Tocoferol

antes que reaccionen con otros lípidos. Esta misma eficacia fue demostrada “in vivo” para interceptar radicales Alcoxilo e Hidroxilos.

Aún no se sabe si la vitamina E puede prevenir el cáncer, la cardiopatía, la demencia, la enfermedad hepática y el accidente cerebrovascular, pero hay recientes estudios que investigan su papel en estas patologías.

El aporte de esta vitamina en relación con el deporte, mantiene divergencias a la hora de relacionarlo con el aumento del rendimiento; hasta el momento podemos apuntar en dirección a la protección celular afirmando que, en casos concretos como son actividades físicas que superen el umbral anaeróbico, o que tengan un componente mayoritario de contracciones excéntricas, o que se realicen en altitud, con el aporte de un complemento de vitamina E, existe una disminución del daño muscular producida por la propia actividad. (Simonschnass & Korniszewski, 1990) Estos estudios hablan de dosis que pueden rondar entre los 400 a los 800 mg, durante un periodo de tiempo de entre 2 y 4 semanas de duración. Es decir, el suplemento de vitamina E en deportistas, mejora de manera indirecta su rendimiento, con la recuperación temprana de sus células musculares y nunca de forma directa mejorando sus capacidades físicas, descartando la idea suplementación mágica para superar marcas individuales.

### **2.6.2.3. Vitamina A (Retinol)**

La vitamina A es liposoluble y está presente en muchas sustancias lipídicas; Actúa como antioxidante previniendo la peroxidación lipídica cuando interactúa con los radicales peroxilos; ayuda a la formación y mantenimiento de dientes sanos y tejidos blandos y óseos, de las membranas mucosas y de la piel. La vitamina A es un nutriente esencial para el ser humano.

Se conoce también como retinol, ya que genera pigmentos necesarios para el funcionamiento de la retina desempeñando un papel importante en el desarrollo de una buena visión.

Sus formas activas son el retinol, el retinal y el ácido retinóico, sustancias que se acumulan en el organismo y en altas dosis pueden ser potencialmente tóxicos. Los efectos de la vitamina A se potencian en presencia

de vitamina E, este efecto es máximo en una proporción 1:10 (retinol: tocoferol), que es precisamente la proporción que mantienen estos compuestos en las membranas de las células biológicas (Niki, Noguchi, Tsuchihashi, & Gotoh, 1995).

La vitamina A es esencial para los atletas, como responsable de la síntesis de proteínas e interviene en todos los procesos anabólicos. También participa en la producción de glucógeno, importante almacén de energía para un entrenamiento intenso.

#### **2.6.2.4. Carotenoides.**

Los carotenos son unos de los más importantes compuestos del grupo de los carotenoides, pigmentos naturales que deben su color a un gran número de átomos de carbono coordinadamente insaturados y dispuestos sucesivamente. Se presenta fundamentalmente en tres formas:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gamma) y también como criptosantina. Actúan como agentes fotoprotectores frente a los efectos perjudiciales de las radiaciones solares, del propio oxígeno y de los pigmentos fotosensibilizadores (Galván, et al., 2008).

Además de estas funciones, los carotenos son de gran importancia fisiológica debido a que una gran mayoría son precursores de la vitamina A. Por ello se encuentran divididos en dos grandes grupos: provitamínicos y no provitamínicos. La capacidad de los carotenos para actuar como provitamina A depende de la conversión en retinol por los animales, así como de la presencia de  $\beta$ -ionona. Los carotenos que contienen como mínimo un anillo de  $\beta$ -ionona pueden convertirse en retinol en los animales. Nutricionalmente el carotenoide provitamínico más importante es el  $\beta$ -caroteno que contiene dos de estos anillos y que se definía hasta hace poco como el que tenía 1/6 de la actividad de retinol. En animales,  $\beta$ -caroteno es convertido en vitamina A cuando el cuerpo lo necesita. Todavía su mecanismo de acción no está claro "in vivo", pero tiende a desactivar las EROs (oxígeno singlete y radicales de lípidos) y reducir la peroxidación lipídica.

Existen estudios "in vitro" que apuntan que la actividad antioxidante de este compuesto es mayor que la del antioxidante,  $\alpha$ -tocoferol (Nakagawa,

Fujimoto, & Miyazawa, 1996). Se ha demostrado que otros carotenoides poseen una alta capacidad antioxidante como son: luteína, zeaxantina, cantaxantina, astaxantina y licopeno.

Aunque menos importante que la vitamina E en el sistema antioxidante, se ha demostrado que el  $\beta$ - caroteno y la vitamina A, conjuntamente con las vitaminas C y E protegen las células de las EROs (Finaud, et al., 2006; Frei, 1994).

### *2.6.2.5. Vitamina C o ácido ascórbico*

Descubierta formalmente en 1912 por los noruegos A. Hoist y T. Froelich cierra el grupo de las vitaminas hidrosolubles junto con las B y es de gran importancia para el normal crecimiento y desarrollo de nuestro organismo. La identificación de su necesidad se remonta a 1747 cuando el cirujano naval escocés James Lind detectara que los cítricos combatían el escorbuto.

Estructuralmente parecido a la glucosa, el ácido ascórbico ( $C_6 H_8 O_8$ ) o vitamina C, es un compuesto hidrosoluble, encontrado principalmente en frutas frescas cítricas, tomate, pimientos verdes y en derivados de animales como la leche. Fue descrito por Álvarez-Salas en 1996.

Es probablemente el antioxidante más importante en fluidos extracelulares y en el citosol. Puede actuar como agente reductor de hidroxilación o reacciones de oxido-reducción, capaz de neutralizar directamente los radicales superóxido, hidroxilo y lipohidroperóxido y formar radical semihidro-ascorbato, que posteriormente es reducido por el ascorbato

Otro de los efectos de la vitamina C es que puede ejercer un papel antioxidante de manera indirecta, mediante la regeneración del alfa-tocoferol o vitamina E (Finaud, et al., 2006; Galván, et al., 2008) generando en contrapartida un radical de vitamina C.

La vitamina C es necesaria para la formación de colágeno, para la correcta cicatrización de heridas, reparación y mantenimiento de los tejidos de las diferentes partes del cuerpo y también para la síntesis o producción de hormonas y neurotransmisores como la noradrenalina y la carnitina e incluso

está presente en el metabolismo del colesterol a ácidos biliares, implicándolo con los niveles de colesterol en sangre y patologías cardiovasculares (Simon & Hudes, 2000). La vitamina C protege relativamente a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contra la oxidación y, por lo tanto, puede disminuir la progresión de aterosclerosis (Frei, 1994).

La vitamina C puede tener efecto prooxidante en presencia de metales de transición libres como hierro y cobre, conduciendo a la generación de radical hidróxilo, por la reacción Fenton. La actividad prooxidante se verá beneficiada frente a bajas concentraciones de ascorbato y altas de metales de transición.

La vitamina C en el ámbito deportivo ha sido utilizada para los procesos de recuperación debido a sus funciones reparadoras de tejido y cicatrizantes. En 2008, un estudio sugirió que la administración oral de vitamina C enfocada a desarrollar la capacidad antioxidante durante un periodo de entrenamiento de resistencia, reducía la biogénesis de mitocondrias, y por lo tanto, reducía las adaptaciones producidas por el ejercicio (Gomez-Cabrera, et al., 2008). Desde entonces, han sido numerosos estudios los que abarcan el papel de la administración de vitamina C y ejercicio físico, poniendo en duda, los beneficios de los antioxidantes en el rendimiento deportivo. En la misma línea, algunas publicaciones han demostrado que el ejercicio físico aumenta la capacidad antioxidante del cuerpo, y por otro lado, la suplementación exógena con vitaminas, reduce la actividad de nuestro sistema antioxidante.

#### **2.6.2.6. *Coenzima Q10 (Ubiquinol)***

El Coenzima Q10 tiene doble papel en la mitocondria, la primera y principal, es ser portador de electrones en la cadena transportadora mitocondrial y la segunda es la de antioxidante, con la capacidad de bloquear la acción de RL y regenerar otros antioxidantes oxidados como la vitamina C y E (J.L. Quiles, et al., 1998).

Su actividad antioxidante fue observada en estudios donde se demostró una alta eficiencia en la inhibición de la lipoperoxidación por acción del Ubiquinol-6 en un estudio en 1966. A partir de aquí comenzaron una serie de investigaciones para clarificar esta propiedad. En las primeras investigaciones se creía que tanto la forma oxidada del Coenzima Q (ubiquinona) como la



reducida (ubiquinol), poseían los mismos efectos antioxidantes. Más tarde se descubrió que era necesaria una alta concentración de la forma oxidada para igualar las propiedades de la forma reducida de forma significativa. Fue demostrado que el ubiquinol presentaba mayor habilidad para inhibir el proceso de peroxidación lipídica generado por el  $\text{Fe}^{2+}$  ascorbato (Kagan et al., 1990).

Se realizaron además estudios que relacionaban la dieta de fuentes grasas con la actividad de la Coenzima Q10, donde se demostró que la inducción de estrés oxidativo, ya fuese de forma exógena (adriamicina) o de forma endógena (ejercicio físico), aumentaba el contenido de Q10 en la membrana, siendo aún mayor cuanto más insaturadas fueran las grasas de la dieta (J. Mataix et al., 1997).

Además de los efectos beneficiosos de la coenzima Q10 en enfermedades cardiovasculares, cáncer y en células envejecidas o apoptóticas, actúa como mediador de expresión génica y proteica en músculo. En este caso, la Q10 interviene como prooxidante dando lugar a  $\text{O}_2^{\cdot -}$  que se convierte en  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la SOD. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  ejercería como segundo mensajero en la expresión genética (Finaud, et al., 2006).

### **2.6.2.7. Ácido Úrico**

El ácido úrico ha sido reconocido como un potente antioxidante extracelular, debido a que elimina radicales solubles en agua tales como ácido hipocloroso, peroxinitrito y oxígeno singlete (Howell & Wyngaarden, 1960; Maples, Jordan, & Mason, 1988). Proviene del producto final del metabolismo de las purinas en humanos, y se encuentra en la sangre en forma de urato mono sódico. Ha sido sugerido que el ácido úrico representa una gran parte (más del 50%) de la capacidad antioxidante plasmática (Wayner, 1987). Las principales funciones del ácido úrico son la protección de las membranas celulares, los eritrocitos, el ácido hialurónico y el ADN frente a la oxidación por radicales libres. Otra propiedad importante del ácido úrico es su acción protectora de la vitamina C (Wayner, 1987) debido a su capacidad para formar complejos estables con iones de hierro, lo que le hace poseer una nueva capacidad antioxidante pero de forma indirecta.

El ejercicio físico intenso incrementa la concentración plasmática de ácido úrico, difundiendo éste a los músculos. Por este motivo podría reconocerse al ácido úrico como uno de los más importantes antioxidantes en músculo y plasma aunque no existen estudios que evidencien si la ingesta exógena de ácido úrico podría causar beneficios al estrés producido por la práctica de ejercicio físico de alta intensidad.

#### **2.6.2.8. Otros antioxidantes**

Según (Galván, et al., 2008), en los últimos años se han descubierto numerosos compuestos antioxidantes, con una acción comprobada in vitro aunque no del todo in vivo. En plasma podemos enumerar varias moléculas proteicas no enzimáticas como: ceruloplasmina, transferrina, albúmina, haptoglobina y hemopexina.

- **Aguas sulfuradas**

Las aguas sulfuradas poseen muchas propiedades terapéuticas, entre las que destacan: propiedad hematopoyética, propiedad destoxicante hepática, propiedad antioxidante y revitalizante.

Aunque la bibliografía existente sobre las propiedades antioxidantes del agua sulfurada es bastante limitada, el estudio de (Hernández Torres, 2004) sugieren que los niveles de malondialdehído disminuyen a medida que los individuos del estudio siguen un tratamiento a largo plazo consistente en la toma de aguas sulfuradas.

En el ámbito del deporte, son necesario estudios que determinen si el tratamiento con aguas sulfuradas en personas deportistas puede no sólo mejorar su rendimiento, sino fundamentalmente prevenir el daño oxidativo que se origina por la práctica deportiva de larga duración y extenuante.

- **Enzimas antioxidante accesorias**

Las células contienen diversas enzimas que también pueden contribuir directa o indirectamente al mantenimiento del equilibrio redox. Entre ellas, la tioredoxina, glutaredoxina, y los sistemas de peroxirredoxina contribuyen de

manera importante y son conocidas como los sistemas de enzimas antioxidantes accesorias.

El sistema antioxidante tiorredoxina está compuesto de tiorredoxina (TRX) y tiorredoxina reductasa. Las células mamíferas contienen dos sistemas TRX, citosólicos (TRX1) y mitocondriales (la TRX2).

Junto con la prevención de la oxidación de las proteínas, otras numerosas funciones fisiológicas de TRX se han descrito, como la reducción de factores de transcripción, la protección contra el estrés oxidativo, y el control de la apoptosis (Arner & Holmgren, 2000). Además, la tiorredoxina reductasa también contribuye como una enzima antioxidante mediante la reducción de hidroperóxidos y funcionando como una reductasa deshidroascorbato dependiente de NADPH para reciclar la vitamina C (Arner & Holmgren, 2000).

Al igual que en TRX, glutaredoxina (GRX) es una oxidoreductasa involucrada en la protección y reparación de tioles proteicos durante los periodos de estrés oxidativo.

La peroxirredoxina (PRX) se descubrió en 1988 y es una peroxidasa novedosa capaz de reducir tanto hidroperóxidos y peroxinitrato. Las células de mamíferos expresan seis isoformas de PRX (PRX I-VI) que se distribuyen diferencialmente dentro de la célula. Numerosos estudios cuestionan la importancia de su papel antioxidante en las células de mamíferos pero por otra parte, la evidencia creciente sugiere que, además de propiedades antioxidantes, estas peroxidasas también pueden desempeñar un papel en la regulación de  $H_2O_2$  como un segundo mensajero en la señalización mediada por receptores.

Los efectos del ejercicio regular sobre los sistemas TRX, GRX, y PRX en lo músculo esquelético siguen siendo desconocidos. Sin embargo todo apunta a que los cambios inducidos por el ejercicio en una o la totalidad de estos sistemas antioxidantes podrían contribuir a la adaptación para su función frente al estado redox.

- **Flavonoides**

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en ciertas bebidas como el vino y la cerveza. Actualmente se les atribuye varias propiedades beneficiosas, entre las que se incluyen efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos (Galati & O'Brien, 2004). El mayor flavonoide occidental en la dieta y el que mayor capacidad antioxidante posee es la quercitina (Duthie, Gardner, & Kyle, 2003). Recientemente se han encontrado estudios que sitúan al Ginkgo biloba como un componente de la dieta efectivo en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, y se emplea comúnmente para tratar enfermedades arteriales e insuficiencia cerebral (Feudis, 1988). El ginkgo biloba es un extracto que contiene, fundamentalmente, dos tipos de constituyentes: flavonoides y terpenoides (Feudis, 1991). Además existen numerosos estudios en ratas y en humanos que relacionan este extracto con la disminución del proceso de peroxidación lipídica. Sin embargo, aunque participa positivamente en el proceso de estrés oxidativo generado por la práctica de ejercicio, no se encontraron evidencias significativas de que constituyese mejoras en el rendimiento físico.

De acuerdo con varias investigaciones, las personas que siguen una dieta rica en flavonoides tienen hasta un 60% menos de probabilidades de padecer enfermedades cardiovasculares (Geleijnse, Launer, van der Kuip, Hofman, & Witteman, 2002; Hertog et al., 1996). Otras investigaciones, en cambio, demuestran que los fenoles de la dieta pueden actuar como sustancias pro-oxidantes en aquellos sistemas que contienen gran cantidad de metales como cobre o hierro (Decker & Brandsch, 1997), lo que puede explicar la base de sus acciones mutagénicas y citotóxicas (Hodnick, Milosavljevic, Nelson, & Pardini, 1988). Ahora bien, debe señalarse que dichas acciones únicamente parecen producirse cuando la dosis ingerida de flavonoides es muy alta (Da Silva et al., 2002), por lo que dosis normales, entre 20 y 26 mg/día (Rimm, Katan, Ascherio, Stampfer, & Willett, 1996) de frutas y verduras (cebollas, manzanas, naranjas y uvas son ricas en flavonoides), así como infusiones de te

verde o te negro, son sin duda, una buena e imprescindible elección en la dieta del deportista.

## 2.7. Función de radical libre en la fatiga muscular

El estrés oxidativo, resulta del aumento en la concentración de EROs en el músculo a causa de ser sometido a una intensa actividad, la cuál se relaciona directamente con los procesos de fatiga y daño post- ejercicio. Por lo tanto, el estrés oxidativo se encontraría relacionado directamente con éstos procesos.

Diferentes hipótesis acerca de los efectos de la fatiga muscular por EROs se resumen en la Ilustración 17.

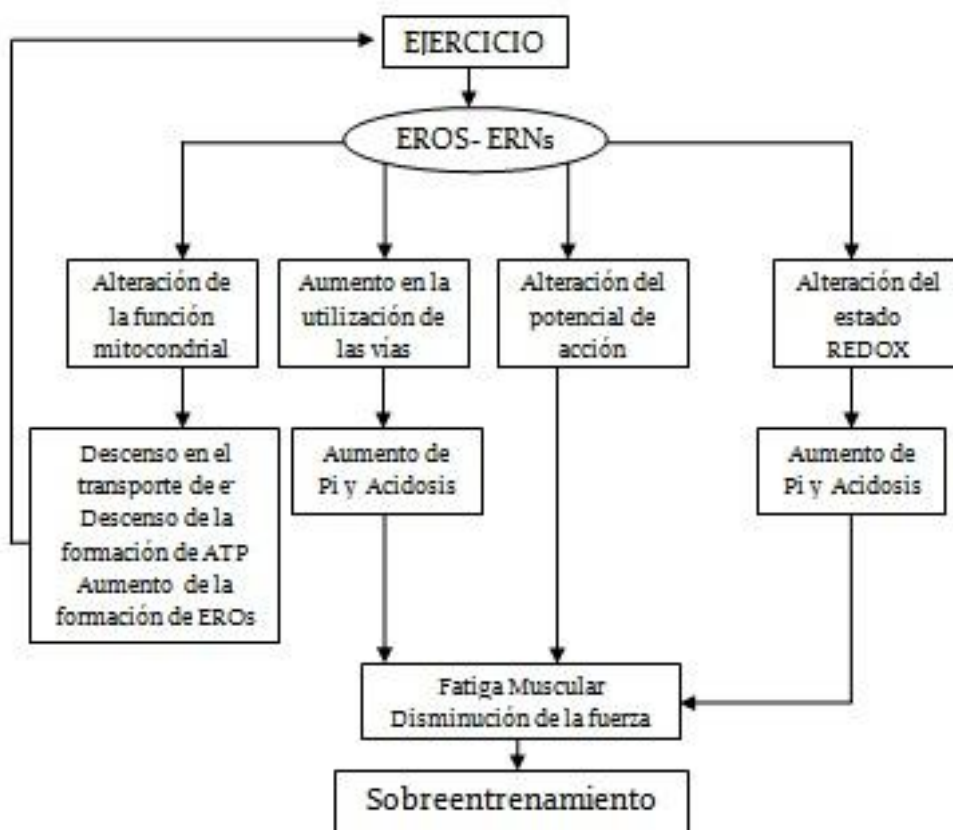


Ilustración 17. Diferentes hipótesis sobre el rol de las EROs sobre la fatiga muscular Tomado de Finaud y col., (2006).

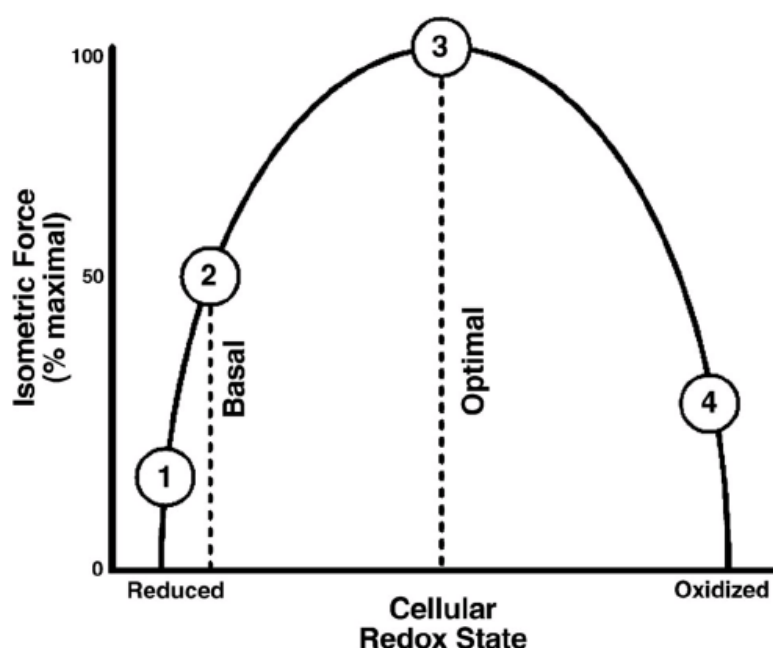
Cuando las EROs están muy concentradas o hacen presencia durante mucho tiempo, influyen de forma inversamente proporcional sobre la fuerza muscular, ésta va disminuyendo con forme la intensidad y la duración del ejercicio aumenta. Así lo demuestran los estudios con haces de fibras musculares extirpadas, los cuales revelan que la producción de fuerza durante contracciones submáximas disminuye a causa de los EROs (Powers & Jackson, 2008).

Varios factores parecen estar implicados en la fatiga muscular inducida por los radicales. Uno de ellos es la alteración de la función mitocondrial, por la exposición a EROs considerado el mayor responsable de la fatiga. Las mitocondrias son especialmente susceptibles al daño oxidativo inducido por ROS sobre lípidos, proteínas y ADN; los daños a ADNmt pueden provocar alteraciones en el complejo respiratorio con la consiguiente disminución de la transferencia de electrones y formación de ATP y por consiguiente, la disminución de su eficiencia. Por lo tanto, parece que este fenómeno podría provocar un aumento en el uso de vías anaeróbicas. Esto podría tener efectos negativos en los músculos debido a que los mecanismos anaeróbicos pueden inducir tanto un aumento en el nivel de fosfato inorgánico (Pi), como la acidosis, dos importantes responsables de la fatiga. La contractilidad de las proteínas (actina y miosina) y la bomba de calcio del músculo, son componentes sensibles al estado redox. Cuando la producción de EROs es significativa, el estado redox puede ser alterado. En consecuencia, la contracción muscular (regulada por la proteína contráctil) y el control de la contracción muscular (regulada por la bomba de calcio), pueden ser alterados.

Las EROs pueden inducir un aumento de calcio intracelular y la inactivación de las enzimas intracelulares (en especial las enzimas implicadas en los mecanismos anaeróbicos y aeróbicos) lo que podría implicar la aparición de fatiga muscular. Además, en ciertas formas de ejercicio, tales como el ejercicio excéntrico, donde existe una gran liberación de hierro de la hemoglobina o ferritina, puede agravar el estrés oxidativo, la fatiga muscular y daño muscular durante y después del ejercicio.

Cuando relacionamos las EROs con producción de fuerza, curiosamente, los RL tienen una influencia importante en la producción de

fuerza en el músculo esquelético no fatigado. Por ejemplo, los bajos niveles de EROS presentes en el músculo esquelético en condiciones basales son un requisito para la producción de fuerza normal. Aunque numerosos investigadores han contribuido a nuestra comprensión de la influencia de EROs en la producción de fuerza muscular, (Reid, Khawli, & Moody, 1993) fueron los primeros en desarrollar un modelo teórico para describir la relación entre el equilibrio muscular y la producción fuerza isométrica. Este modelo se plantea en la Ilustración 18.



*Ilustración 18. Modelo bifásico del efecto de las EROs en la producción de fuerza muscular propuesto por (Reid, 2008)*

El paradigma de (Reid, et al., 1993) predice que un óptimo estado redox celular es ideal para la producción de fuerza muscular. De ello se deduce que una desviación del equilibrio redox óptimo conduce a una pérdida de producción de fuerza. Una cantidad mínima de EROs beneficia la generación de fuerza y es lo denominado como impacto positivo de EROs. Esto se invierte a concentraciones más altas de radicales y a mayor duración de exposición a los mismos; esta observación ha despertado interés en la posibilidad de que los ROS puedan contribuir a la fatiga muscular durante el ejercicio prolongado.

El primer informe que indica que las EROS contribuye a la fatiga muscular apareció en 1990. Este primer estudio demostró que el captador de EROS N-acetilcisteína retrasa la fatiga muscular en una preparación in situ del músculo diafragma (Shindoh, Dimarco, Thomas, Manubay, & Supinski, 1990). Desde este inicial informe, numerosos estudios in vitro como in situ, han investigado el papel que juegan las alteraciones redox en el desarrollo de la fatiga muscular. La mayoría de los estudios demuestran que puede producirse una disminución de la fatiga muscular en contracciones submáximas (Powers & Jackson, 2008), gracias a nuestro sistema antioxidante, enzimático y no enzimático. En contraste, parece que esto no es suficiente para retrasar la fatiga muscular cuando las contracciones son próximas al máximo (Matuszczak et al., 2005; Reid, et al., 1993). Por último, los estudios que examinan los efectos de la antioxidantes durante la recuperación del ejercicio muscular fatigante son incompatibles, unos indican una recuperación más rápida (Diaz, She, Davis, & Clanton, 1993), mientras que otros no pueden observar un tiempo de recuperación más rápido (Khawli & Reid, 1994; Reid, et al., 1993)

La mayoría de los estudios que se han realizado “in vivo” demuestran que la suplementación con vitaminas no sirve para mejorar el rendimiento en ejercicios de resistencia en humanos, ni disminuir la fatiga muscular (Powers & Jackson, 2008). Por el contrario recientes investigaciones abordan que la administración del antioxidante N-acetilcisteína (NAC) retrasa fatiga del músculo durante el ejercicio submáximo en diferentes pruebas, tal y como se muestra en la tabla 10, realizada en seres humanos.



*Tabla 10. Estudios del efecto del tratamiento con NAC en diferentes ejercicios submáximos. Tomado de (Powers y Jackson, 2008).*

Mode of exercise	Subjects Pool	NAC treatment	Exercise – Dependent Measure	Performance Improvement	Reference
<b>Cycling to fatigue</b>	Adult male endurance athletes	Multile iv dose before and during exercise.	Time to fatigue	+ 24%	McKenna y cols. (2006)
<b>Breathing against inspiratory load</b>	Adult men	Single iv dose preexercise	Time to task failure	+ 50%	Travaline y cols (1997)
<b>Repetitive Handgrip exercise</b>	Adult men and women	Single iv dose preexercise	Time to task failure	+ 15%	Matuszczak y cols (2005)
<b>Repeated electrical stimulation limb muscle</b>	Adult men	Single iv dose preexercise	Force decline during 30 min of contraction	+ 15%	Reis y cols (1992)

La administración de NAC también se ha demostrado que retrasa la fatiga en los experimentos con animales utilizando tanto *in vitro* e *in situ*. Sin embargo, la NAC no aparece para retardar la fatiga muscular durante el ejercicio a casi máxima intensidad (Diaz, et al., 1993; Matuszczak, et al., 2005).

### **2.8. Importancia de la actividad física frente a un estilo de vida sedentario**

La esperanza de vida ha sido un hecho de máxima evolución en este último siglo. A principios del siglo 20 la media de vida se situaba muy inferior a la actual, sobre los 47 años de edad debido al contexto histórico –social en el que la población se encontraba, donde la falta de higiene, la mala alimentación, mala eliminación de aguas residuales, contaminación de la comida y el agua y la mísera situación de las viviendas contribuían a la aparición de numerosas enfermedades infecciosas colocándolas como principal causa de muerte. A todo ello habría que sumarle la mala situación de la sanidad pública y la falta

de medios para el tratamiento de estas enfermedades. Por ello, a lo largo de este siglo hubo una alta dedicación a la mejora de la sanidad e higiene pública que desembocó en una mejor nutrición y organización social. Como consecuencia, a principios del siglo XXI, la esperanza de vida aumentó considerablemente hasta los 77.8 años de media.

Actualmente, la probabilidad de morir por una enfermedad contagiosa es relativamente baja, sin embargo, a pesar del importante avance en medicina y diagnóstico y tratamiento de enfermedades, las denominadas enfermedades crónicas se encuentran a la cabeza en la causa de muerte de nuestra sociedad. Aproximadamente el 80% de los adultos mayores de 65 años tienen al menos una enfermedad crónica y alrededor del 50% tienen dos o más de ellas, las cuales aceleran el proceso de envejecimiento y finalmente la muerte (M. A. Davies, 1998). Cuando hablamos de enfermedad crónica según la OSM, nos referimos a aquellas como el asma, cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, accidentes cerebrovasculares, sordera, diabetes, reumatismo, enfermedades crónicas respiratorias, hipertensión, problemas a la tiroides, ceguera, asma y alergias, entre otras.

Según la OMS, las enfermedades crónicas son responsables del 60 por ciento de la mortalidad mundial. Se estima que en 2005 murieron 35 millones de personas por causa de una enfermedad crónica, de las cuales el 70 por ciento eran mujeres. Cerca del 80 por ciento de esas muertes se producen en países que tienen ingresos medianos o bajos, sin embargo, en Estados Unidos representan la mayor fuente de invalidez y muerte.

La gravedad del escenario ha llevado a la OMS a crear el Departamento de Enfermedades Crónicas y de Promoción de la Salud. Éste ha desarrollado la estrategia “Promover. Prevenir. Tratar. Cuidar”. La idea es incentivar hábitos que tiendan hacia una vida sana y crear la costumbre entre las personas de cuidar su salud.

Tanto el hombre como la mujer han sufrido el efecto del avance social y económico afectando al desarrollo de su salud en distintas vertientes; pero a la hora de hablar de principal causa de mortalidad, la media queda muy igualada.

La OMS ha publicado un reciente informe que expone que más del 40% de cáncer y al menos el 80% de todas las enfermedades de corazón, accidente cerebro-vascular y diabetes tipo 2, serían impedidos si se redujesen o eliminaran los factores de riesgo asociados a estas enfermedades crónicas (por ejemplo, dietas no saludables, inactividad física y el consumo de tabaco), promoviendo así la prevención de las mismas, viviríamos una notable mejora en la salud y en la esperanza de vida, evitando efectos asociados como el sufrimiento, la discapacidad y los costos sociales de atención sanitaria.

Esta restricción sugiere posibles efectos beneficiosos en el proceso de envejecimiento del ciclo vital. Por ello mismo, actualmente podemos observar una alta potenciación de la práctica deportiva, por parte de los organismos políticos contra al estilo de vida sedentario, con el objetivo de aumentar la calidad de vida, retrasando la aparición de enfermedades crónicas y en definitiva retrasando el proceso de envejecimiento.

### **2.9. Importancia de la actividad física como herramienta anti envejecimiento**

En general, los tejidos de vertebrados mejoran su capacidad funcional de forma proporcional al uso que se hace de ellos. Cuando sujetos de edades comprendidas entre los 70-79 años de edad realizan ejercicios de resistencia durante 6 meses disminuyen la presión arterial con respecto a los controles (Ettinger, 1989). Además se observa un descenso de la frecuencia cardiaca y un aumento del volumen sistólico en reposo (Cononie et al., 1991).

En global se mejora la circulación sistólica al aumentar el número de capilares e incrementar la circulación colateral en las extremidades inferiores (Ettinger, 1989). Además de reducir la hipertensión, el ejercicio aeróbico también reduce la incidencia de hiperlipidemias, obesidad, diabetes mellitas tipo 2, etc.

Cuando el ejercicio se hace crónico y se prolonga en el tiempo, los beneficios incluyen reducción del riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, mejora en el control del peso, descenso en la presión arterial, incrementos en la capacidad aeróbica y en general prolongación de las expectativas de vida en 2 años (Heyden & Fodor, 1988).

Cuando varones de entre 50 a 60 años realizan ejercicios aeróbicos vigorosos con regularidad, alcanzan  $VO_2\text{max}$  de un 20 a un 30% más elevado que varones jóvenes sedentarios. Incluso se ha descrito que en esas condiciones superan en un 50% el  $VO_2\text{max}$  de ex atletas de la misma edad que dejaron de entrenar (Hagber y col; 1983).

La actividad física regular tiene una gran influencia positiva sobre la función del sistema inmunitario, reduciendo los riesgos de las enfermedades autoinmunes y del cáncer. El ejercicio físico tiene la potencialidad de ralentizar los deterioros estructurales y funcionales asociados a la edad tanto del músculo esquelético como de hueso, tendones y ligamentos (Hagber y col; 1983). El entrenamiento de potencia adecuado a individuos de edad avanzada, incrementa la potencia muscular un 174-180% en hombres y mujeres de 60 a más de 90 años de edad (Fiatarone et al., 1990). El regreso a la vida sedentaria hace que de nuevo se pierda un 32% en potencia, además de un descenso en la propia masa muscular (Fiatarone, et al., 1990).

Como decíamos en párrafos anteriores, junto al descenso de la masa muscular, la osteoporosis es otro problema de la población envejecida, en particular de las mujeres. El ejercicio moderado puede retardar el progreso de esta enfermedad disminuyendo además la tasa de fracturas con respecto a sedentarios de la misma edad (Lexell, Taylor, & Sjostrom, 1988).

Pero sin lugar a dudas es en los aspectos mentales en donde la actividad física regular produce importantes beneficios en edades avanzadas. Desde hace años son conocidos los avances que la práctica deportiva reporta a la mejora de la salud mental y la conservación de las facultades intelectuales y de relación. Actualmente este campo avanza hacia el área de la memoria.

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

Científicos del Instituto Taub de Investigación sobre la Enfermedad de Alzheimer de la Universidad de Columbia, en Estados Unidos, han descubierto que las personas que realizan ejercicio físico de manera regular conservan mejor y durante más tiempo su memoria. Estos investigadores han podido observar que la práctica deportiva incide sobre una zona del hipocampo, conocida como gyrus dentado, que es donde se inicia el declive de la memoria asociado a la edad, un proceso que suele comenzar a los 30 años, aproximadamente. Ahora se sabe, gracias a la realización de distintas resonancias magnéticas, que tras el ejercicio físico tiene lugar un proceso de neurogénesis en el gyrus dentado, algo que hasta el momento sólo se había probado en análisis postmortem en animales.

Además de este avance, se conoce que la práctica de un programa de ejercicio sistematizado de media duración (10 semanas) con una intensidad superior al 70% de la capacidad del individuo, ejerce una influencia muy positiva en el estado de ánimo, problemas de relación social, dolor y/o ansiedad.

La práctica de ejercicio ha demostrado ser eficaz en la reducción de la sintomatología depresiva en adultos mayores, cognitivamente sanos, en adultos mayores deprimidos y los adultos mayores con enfermedades médicas (Mahler, Cunningham, & Curfman, 1986; Mazzeo et al., 1998; McCullagh et al., 2012).

Todos estos estudios nos dirigen hacia los beneficios de una práctica deportiva regular frente al estilo de vida sedentario instalado en este siglo.

## 2.10. Estrés oxidativo y tipo de práctica deportiva

Se sabe con cierta precisión los beneficios de la práctica del deporte de tipo aeróbico en pacientes de edad avanzada, pero no está claro en qué intensidad, en términos de consumo de oxígeno, debe llevarse a cabo para producir el máximo número de adaptaciones capaces de retrasar la aparición de marcadores del envejecimiento.

Por otra parte ni siquiera está claro si el deporte de alto nivel caracterizado por un alto consumo de oxígeno y, por tanto, con alta producción de oxígeno y derivados de especies reactivas (radicales superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo) y alto daño en las células después del ejercicio, pueden acelerar los mecanismos de envejecimiento, o al menos en las mitocondrias.

El ejercicio, aunque, sin duda, aportará beneficios al cuerpo, puede ser, en determinadas circunstancias, una de las causas de producción de los RL, o más correctamente, de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Huertas, et al., 1994). Su acción, en los músculos, como en muchas enfermedades, es también con la participación del sistema inmunitario, lo que contribuye significativamente a la aparición de un cuadro fisiopatológico secundario respecto al daño tisular inicial, lo que justifica la aparición de dolor muscular y la respuesta inflamatoria post-ejercicio (Niess, et al., 1999). Por supuesto, las circunstancias que activan esto se definen y se limitan a condiciones especiales. En primer lugar, un entrenamiento físico muy intenso, de larga duración y / o que se dedican principalmente a los músculos extensores (Jackson & Ofarrell, 1993), podrá afectar a la fibra muscular, que se encuentra en una incapacidad temporal a seguir prestando los mismos servicios de procesos metabólicos y las estructuras de la contractilidad del músculo (Pincemail, Defraigne, & Limet, 1996). Por supuesto, la actividad física, aunque moderada, siempre es asociado con el consiguiente exceso de producción de RL, pero si frente a ella el cuerpo responde inmediatamente activando el sistema de defensa antioxidante, normalmente éste será suficientemente

rápido y eficiente para reponer nuevamente el orden fisiológico a nivel celular (Pincemail, et al., 1996).

Cabe señalar que el estado nutricional influye y afecta a la respuesta oxidativa en términos de intensidad y gravedad y podría pasar factura a una respuesta fisiológica o fisiopatológica del cuerpo. Esto es debido a que en un ejercicio muscular intenso, el estrés oxidativo que se produce, compromete significativamente al sistema de defensa antioxidante endógeno, cambiando la balanza hacia un agotamiento de sus componentes. Esto aumenta significativamente la vulnerabilidad de las diferentes estructuras de células y tejidos contra especies reactivas de oxígeno, que pueden desencadenar las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica, que es el evento más involucrado en la determinación de la lisis de las membranas celulares.

La actividad deportiva induce un consumo de oxígeno muy elevado para hacer frente a la mecánica de trabajo y metabólica, pero hasta el 5% de oxígeno consumido puede transformarse en radicales superóxido en nuestras mitocondrias, haciendo la actividad física una situación de gran estrés oxidativo. El daño a nivel de ADN mitocondrial provocado por el estrés es el más importante y la cuestión más delicada para las personas que practican deporte. Por ello es importante determinar el tipo de volumen e intensidad de actividad física adecuada según la edad y nivel de entrenamiento de la persona, para desencadenar aquellas adaptaciones positivas del ejercicio contra el envejecimiento y enfermedades asociadas al mismo. Así mismo es importante diferenciar la producción de estrés oxidativo según la práctica deportiva que se realice en predominio.

### **2.10.1. Práctica deportiva con predominio aeróbico**

Una de las cualidades físicas más importantes que se desarrollan con la práctica deportiva y que posee una estrecha relación con la mejora del estado de salud en una persona es, sin duda, la capacidad aeróbica. Esta cualidad está ligada al consumo de oxígeno utilizando a éste como herramienta clave para la producción de energía. La actividad muscular es producida gracias al

aporte energético procedente de la transformación de la energía almacenada en los nutrientes, en energía mecánica. Para ello nuestro organismo dispone de diferentes almacenes de energía y diversas vías metabólicas, que se ponen en funcionamiento dependiendo de las necesidades de cada situación. Así pues, el oxígeno es una molécula esencial para la oxidación de los nutrientes almacenados y la obtención de energía (ATP) mediante el denominado metabolismo aeróbico u oxidativo. Si lo comparamos con el metabolismo anaeróbico, el oxidativo produce mayor cantidad de sustratos de energía (ATP) y demora el acúmulo de lactato en sangre, lo que repercutiría en un retraso de la aparición de la fatiga y por lo tanto en una práctica deportiva más extensa. Es por ello por lo que los deportistas de élite de modalidades aeróbicas intentan aumentar su capacidad aeróbica en lo máximo que les sea posible.

La práctica deportiva de carácter aeróbico, está unida a un mayor consumo de oxígeno necesario para que sea posible el aporte de energía a las células durante la actividad a desarrollar. Así mismo, el ejercicio físico puede estar asociado con un incremento de 10 a 20 veces mayor en la captación total del oxígeno (Astrand, 1987); si profundizamos a nivel celular, el flujo de oxígeno en las fibras musculares esqueléticas periféricas puede ser aumentado de 100 a 200 veces durante el ejercicio físico o incluso el ejercicio moderado puede incrementar la producción de radicales libres y abrumar las defensas antioxidantes, resultando en un estrés oxidativo (C.K. Sen & Packer, 2000).

Los investigadores (Tappel & Dillard, 1981), fueron los primeros en demostrar que en humanos, incluso el ejercicio de moderada intensidad podría conducir a un incremento en la peroxidación lipídica; descubrieron que tras 60 minutos de bicicleta al 25-75% del  $VO_2$ máx, existía un incremento de 1,8 veces en el nivel de pentosas exhaladas, un posible subproducto de daño oxidativo de origen lipídico. Más adelante, (K. J. A. Davies, et al., 1982), profundizaron en el tema utilizando el método de espectroscopia de resonancia paramagnética de electrones para la detección de RL en los tejidos y demostraron que en ratas sometidas a un ejercicio exhaustivo en cinta ergométrica, la concentración de RL aumentaba de 2 a 3 veces en el musculo y en el hígado. Los mismos investigadores demostraron esta teoría también en humanos y con métodos que incluían ejercicios predominantemente aeróbicos



## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

como correr, nadar, y bicicleta. Desde entonces hasta hoy se han acumulado crecientes expectativas que sostienen la hipótesis de que el ejercicio físico aeróbico puede producir el aumento en la producción de RL induciendo estrés oxidativo medido como daño oxidativo producido en lípidos, proteínas e incluso en ADN (Atalay et al., 2000; Goldfarb, McIntosh, & Boyer, 1996; L.L. Ji, 1999; Khanna et al., 1999; C. K. Sen, Atalay, & Hanninen, 1994; C.K. Sen & Packer, 2000).

En la tabla 11, podemos observar otros estudios que apoyan que el ejercicio aeróbico produce Radicales Libres.

*Tabla 11. Investigaciones que relacionan la producción de Radicales Libres con la práctica deportiva predominantemente aeróbica. Tomado de, De la Cruz (2006).*

<b>Autor</b>	<b>Realizado en</b>	<b>Consecuencias en los marcadores de estrés oxidativo</b>
Mena y cols; 1991	Ciclismo	Aumento de las enzimas antioxidantes.
Sastre y cols; 1992	AFC	Aumenta la oxidación del Glutation.
Koz y cols, 1992	Natación (ratas)	Aumentan los niveles de MDA y disminuye el ácido ascórbico.
Marzatico y cols; 1997	Maratón	Aumenta los niveles de MDA.
Okamura y cols; 1997	Maratón	Aumenta presencia de 8 OhdG en orina.
Liu y cols; 1999	Maratón	Aumenta formación de dienos conjugados.
Chil y cols; 2000	Media Maratón	Aumentan los niveles de MDA.
Molina y cols; 2000	Carrera 30´	Aumentan MDA y disminuye el cociente GSH/GSSG.
Childs y cols; 2001	AFE	Aumenta formación de hidroperóxidos lípidos.
Mastaloudis, 2001	Ultra distancia	Aumentan los F <sub>2</sub> isoprostanos
Santos- Silva y cols; 2001	Natación	Aumentan los derivados de la peroxidación lipídica.

*AFE= Actividad Física Concéntrica. AFE: Actividad Física Excéntrica*

Se ha sugerido, que en respuesta a una simple ejecución de una ejercicio hay una intensidad por debajo de la cual el estrés oxidativo no ocurre (Alessio, 1993), aunque depende de las características de la población de estudio (Aldred & Rohalu, 2011). Este fenómeno no se produce con el ejercicio de baja intensidad (<50% VO<sub>2</sub> máx), en este caso, la capacidad antioxidante no es excesiva y el daño inducido por el RL no es evidente. Según varios autores, el aumento de MDA en sangre se produce en esfuerzos por encima del 70% del VO<sub>2</sub>max, aunque en periodos cortos de ejercicio. Cuanto mayor es la intensidad del ejercicio (en relación ya se a de carga o duración) mayor es la producción de RL durante la actividad.

Otros estudios muestran que el estrés oxidativo no aumenta después de un intenso ejercicio aeróbico. Estos resultados pueden explicarse por el estado de nutrición (que no siempre es controlado en los estudios), o la intensidad del ejercicio o el nivel de entrenamiento. Efectivamente, estos estudios se han realizado con atletas entrenados que estaban habituados a efectos de ejercicio tales como la producción de RL. Los sujetos entrenados pueden mostrar un estrés oxidativo al igual que los sujetos sedentarios.

El ejercicio de resistencia causa a algunos cambios en la concentración de antioxidantes no enzimáticos o de la actividad de las enzimas. Numerosos estudios, tanto en animales y en seres humanos, han demostrado que la actividad de enzimas antioxidantes aumenta en la sangre o en los tejidos después de ejercicios aeróbicos (Elosua et al., 2003). Esta adaptación se produce muy rápidamente (5 minutos) después de la producción de RL y parece ser específica para la oxidación de las fibras musculares, que son el principal lugar de producción de RL durante el ejercicio. Sin embargo, el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes no es proporcional a la intensidad del ejercicio. Los efectos de la actividad aeróbica no son limitantes para la enzima antioxidante.

Las concentraciones de aquellos antioxidantes no enzimáticos (en el plasma, orina o tejidos) son modificados, pero los resultados son a menudo contradictorios. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que la disminución de GSH durante ejercicio, es debida a su uso contra los RL (Jones, 2008). Por otro lado, la vitamina E y C y ácido úrico, tienden a aumentar después del esfuerzo de resistencia. La Vitamina E y C parecen ser movilizados a partir de sus respectivas reservas para preservar el cuerpo contra los efectos de los RL, la vitamina C actúa recíprocamente con la vitamina E regenerando el radical tocoferol formado (Clarkson & Thompson, 2000).

El aumento de ácido úrico no puede considerarse como una adaptación específica contra el estrés oxidativo, ya que es el producto final del ciclo de la purina. Así mismo, todos estos cambios, provocan un aumento en la

capacidad total antioxidante, como puede verse en muchos estudios. (Fatouros et al., 2004).

### **2.10.2. Práctica deportiva con predominio anaeróbico**

El ejercicio anaeróbico es un tipo de ejercicio que se incluye en una amplia variedad de actividades deportivas. La información sobre la producción de RL, como resultado de un intenso entrenamiento anaeróbico es muy baja, en comparación con lo que se conoce acerca de la aeróbica. Sin embargo, varios estudios muestran en general un aumento de estrés oxidativo después de un ejercicio supra máximo, como una carrera intermitente, sprint, saltos, o una serie de saltos, ejercicios de resistencia (excéntrico o concéntrico) o test de Wingate cicloergómetro.

El aumento de la producción de RL, específicamente en el ejercicio anaeróbico, podría ser mediada a través de varios mecanismos, además de la pérdida de electrones, como durante la actividad aeróbica. La producción de la xantina oxidada, la isquemia reperusión y el aumento de la fagocitosis parecen estar involucrados en la producción de RL durante la actividad anaeróbica. Además el aumento significativo del ácido láctico y la acidosis, catecolaminas e inflamación post-ejercicio, característicos del ejercicio máximo, son otros factores que pueden aumentar la producción de RL (Powers & Jackson, 2008).

Parece posible que la reperusión post- isquémica de la actividad muscular está notablemente involucrada en el estrés oxidativo durante y después de la actividad anaeróbica. Precisamente este tipo de ejercicio mejora significativamente el catabolismo de la purina y provoca una rápida desoxigenación (fenómeno de isquemia reperusión).

Estos dos fenómenos son conocidos por aumentar la actividad de la xantina oxidasa, lo que acelera la producción de RL. La xantina oxidasa ha demostrado generar RL durante la reperusión isquémica. Durante el proceso de isquemia en los tejidos, se ha indicado que la xantina deshidrogenasa pasa

a través de la conversión proteolítica a la forma oxidada, que utiliza  $O_2$  como aceptor de electrones. Se sabe que la xantina oxidasa en la presencia de sustratos hipoxantina o xantina reduce la molécula del oxígeno en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Está recientemente demostrado que la enzima puede reducir  $H_2O_2$  a OH. Por lo tanto se ha supuesto, que la xantina oxidasa y su sustrato pueden estar presentes en altas concentraciones en el tejido en isquemia y consecuentemente puede ser derivada la producción de RL de oxígeno en el momento de la reperusión. El radical  $OH^-$  y  $O_2^-$  generados por las enzimas podrían reaccionar con proteínas y membranas celulares, causando daños celulares.

Otra fuente de producción de RL durante el ejercicio anaeróbico deriva de la inflamación y el daño celular, que a menudo se manifiesta inmediatamente después de un ejercicio traumático, como el deporte de impacto y los ejercicios excéntricos. La liberación de hierro y de la hemoglobina y de la ferritina podría amplificar la respuesta inflamatoria y estrés oxidativo. Hace unos años, se investigó la producción de EROs y ERON, tras un ejercicio con un alto componente excéntrico realizando una carrera cuesta abajo, a diferencia de otros sujetos que corrieron sin inclinación, produciéndose cambios significativos en las EROs, ERON y MDA, a las 72 horas de haber realizado el esfuerzo (Close, Ashton, Cable, Doran, & MacLaren, 2004). Como este son números las investigaciones las que han estudiado el efecto de un ejercicio con alto componente excéntrico con la producción de daño en lípidos y ADN, midiendo diferentes marcadores como concentraciones de TBAR'S, 8 -isoprostano, LOOH y 8-OHdG.

Además de todo lo expuesto anteriormente, hay que mencionar también, que el ácido láctico se relaciona con una inducción de daño oxidativo en ejercicios supramáximos (Koide, Wieloch, & Siesjo, 1985) así como con la autooxidación de las catecolaminas (Cohen & Heikkila, 1974) y el mecanismo de isquemia- reperusión.

### 2.10.3. Práctica deportiva mixta

Puede definirse como una mezcla de tipo de actividad que impliquen tanto el metabolismo aeróbico como el anaeróbico en una relación equilibrada. Deportes de equipo como el fútbol, el rugby y el baloncesto son algunos ejemplos de este tipo de ejercicio, incluyendo fases aeróbicas y anaeróbicas. Los efectos de este tipo de ejercicio sobre el estrés oxidativo ha sido fuente de gran parte de la investigación. La literatura tiende a demostrar que el ejercicio mixto tiene lógicamente el mismo efecto en la producción de RL como en los ejercicios específicos aeróbicos y anaeróbicos. En cambio los efectos de los antioxidantes son muy contradictorios. Donde en la mayoría de deportes tanto con predominio aeróbico como anaeróbico se produce una mayor actividad de las enzimas antioxidantes, hay estudios realizados en deportes mixtos como por ejemplo, rugby, donde después de analizar el estado antioxidante y las EROs, se comprobó que en el periodo de alta competición hubo un descenso del sistema antioxidante enzimático y no enzimático, principalmente de la actividad de la Vitamina E (Finaud, et al., 2006). Este resultado es sorprendente si se compara con los efectos durante el ejercicio aeróbico y anaeróbico de la SOD, CAT y GPX.

En contraste, algunos estudios sugieren que los antioxidantes no enzimáticos pueden tener el mismo desarrollo después del ejercicio de tipo mixto comparado con el el ejercicio aeróbico y anaeróbico: un aumento de ácido úrico y una disminución de GSH. Sin embargo existe una considerable falta de conocimientos sobre la respuesta de otros antioxidantes no enzimáticos.

Por lo tanto, el ejercicio aeróbico, anaeróbico y mixto, causan un aumento de la producción de RL. Del mismo modo, los seres humanos tienen una reacción de adaptación con un aumento en la movilización de una variedad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en las células o en el plasma. En la mayoría de los casos, la capacidad antioxidante es desbordada, lo que conduce a una situación de estrés oxidativo, aún más importante si la

intensidad y la duración de la actividad son altos y si los sujetos tienen un bajo nivel de entrenamiento y un estado nutricional inadecuado.

Algunas diferencias se pueden observar entre el ejercicio aeróbico y anaeróbico, o mixto. A diferencia del ejercicio de resistencia, la cadena respiratoria mitocondrial no es el más importante lugar de producción de RL en el ejercicio anaeróbico y mixto. La isquemia reperusión, acidosis y la oxidación de las catecolaminas, son otros fenómenos implicados en el estrés oxidativo durante el ejercicio supramáximo (Cohen & Heikkila, 1974). Hay una gran falta de información y los estudios son necesarios para comprender el papel del estrés oxidativo en este tipo de ejercicio, que es probablemente demasiado complejo para investigar.

## **2.11. Efectos del entrenamiento sobre el estrés oxidativo**

### **2.11.1. Efectos según tipo de entrenamiento**

#### **2.11.1.1. Entrenamiento aeróbico.**

La mayoría de los estudios muestran que el entrenamiento de resistencia reduce el estrés oxidativo y el daño muscular post-ejercicio. Estos resultados concuerdan con el pensamiento general de que el ejercicio aeróbico regular puede luchar contra el envejecimiento de las células y la aparición de algunas formas de cáncer. Se ha demostrado que un programa de entrenamiento aeróbico de media duración se relaciona con la reducción del riesgo de enfermedades coronarias (Powell, Thompson, Caspersen, & Kendrick, 1987). Claramente el ejercicio físico provoca adaptaciones en nuestro organismo que dependen del tipo y duración del mismo; por ejemplo, en condiciones normales, el ejercicio físico aeróbico de forma puntual seguido de periodos de descanso completo, posee la capacidad de preparar al organismo para hacer frente al estrés por ejercicio generando una adaptación crónica (Radak, Chung, & Goto, 2005). En el músculo esquelético, por ejemplo, una única sesión de larga duración de ejercicio aeróbico disminuye la concentración de glucógeno, mientras que la adaptación normal inducida por el entrenamiento aeróbico, es un aumento de la concentración de glucógeno que excede

significativamente el nivel en que se encuentra en el músculo no entrenado. De manera similar, una sesión intensa anaeróbica aumenta el nivel de ácido láctico, que puede ser tan alta como 20-25 mmol / l en la sangre, pero la práctica regular anaeróbica está asociada con la mejora de su eliminación. Por ello se sugiere que la adaptación de un entrenamiento aeróbico pueda producir una disminución del estrés oxidativo generado por el ejercicio tal que no aumente de modo evidente en atletas altamente entrenados, no obstante, existe una notable certeza del fenómeno inflamatorio inducido por el ejercicio. Existe una gran evidencia científica que soporta que el ejercicio induce alteraciones considerables en el sistema inmune (Radak, et al., 2005). En general, el ejercicio de alta intensidad o duración de tiempo puede causar inmunosupresión y aumento de la susceptibilidad a la infección. De hecho, infecciones de las vías respiratorias suelen presentarse después de arduos episodios de ejercicio de alta intensidad (Heath, Macera, & Nieman, 1992). Este nivel de carga de ejercicio se asocia con la deuda glutamato, lo que podría alterar la eficiencia del sistema inmune (Lehmann et al., 1995). A su vez, resultados a largo plazo de práctica deportiva aeróbica están relacionados con el aumento de la secreción de cortisol, que también podría conducir a inmunosupresión (Okutsu, Ishii, Niu, & Nagatomi, 2005; C. Smith & Myburgh, 2006). Por lo tanto, el ejercicio de alta intensidad o de larga duración crea un "periodo de ventana abierta", lo que indica un mayor riesgo de infección.

Por otra parte, el ejercicio de intensidad moderada y de duración, generalmente puede considerarse como un regulador del sistema inmune, dando lugar a una mayor resistencia frente a la infección y un menor riesgo de aparición de enfermedad, incluyendo ciertos tipos de cáncer (Radak, et al., 2005).

Sin embargo, en conclusión, todos estos resultados no pueden asegurar si esta disminución en el estrés oxidativo y adaptaciones en el sistema inmune, deriva de una adaptación en los procesos de generación de RL provocando una disminución de los mismos durante o después del ejercicio, o bien, se debe a una adaptación en el sistema antioxidante provocando una mejora de la eficiencia del mismo.

El efecto de entrenamiento aeróbico sobre los antioxidantes enzimáticos es visible a nivel muscular, plasmático, hepático y cardíaco. En el músculo, algunos estudios muestran que existe una adaptación específica de los antioxidantes enzimáticos particularmente cuando el músculo contiene un alto porcentaje de fibras tipo I.

Los resultados relativos a los efectos del entrenamiento sobre los antioxidantes no enzimáticos son muy contradictorios en comparación con los estudios que muestran una mejora o una reducción de la capacidad antioxidante total o de un solo antioxidante en sujetos entrenados con respecto a los sujetos sedentarios (Covas et al., 2002; Mena et al., 1991).

Algunos estudios muestran que la adaptación antioxidante puede estar relacionada con el volumen de entrenamiento o con el  $VO_2$  máx. Sin embargo, parece que el protocolo de entrenamiento debe ser suficientemente largo e intenso para crear una respuesta adaptativa. Por ejemplo, un protocolo de ocho semanas aumenta el  $VO_2$  máximo sin necesidad de aumentar el potencial antioxidante, mientras que un protocolo de diez semanas, más largo y más intenso, aumenta el  $VO_2$  máximo y la actividad de ciertos antioxidantes. Numerosos estudios aportan que la actividad enzimática mejora tras el ejercicio en personas entrenadas a diferencia de no entrenadas (Elosua, et al., 2003).

Para algunos estudios la medición de la contribución nutricional en antioxidantes juega un papel muy importante, ya que consideran que la eficiencia del sistema antioxidante depende en gran parte de la alimentación.

#### ***2.11.1.2. Entrenamiento Anaeróbico.***

Existen numerosos datos sobre el efecto del entrenamiento anaeróbico sobre el estrés oxidativo. Se ha demostrado que los sujetos entrenados anaeróbicamente tienen menos estrés oxidativo y menos daño muscular durante y después del ejercicio en comparación con sujetos no entrenados.



Estas mejoras son comparables con los observados en atletas de resistencia. Las diferencias metodológicas (características de la población, el protocolo de entrenamiento y las mediciones biológicas) pueden explicar algunas discrepancias presentes en la literatura. De acuerdo con algunos estudios, los sujetos entrenados anaeróbicamente tienen una mejor actividad de enzimas antioxidantes en la sangre, en los tejidos, especialmente los músculos que se usan, frente a los no entrenados.

Las diferencias entre los resultados pueden explicarse por la administración de la dosis y el protocolo de entrenamiento. Ciertamente, como para el entrenamiento aeróbico, parece que la duración del protocolo es importante, apareciendo la adaptación sólo tras muchas semanas de intensa práctica. Para los antioxidantes no enzimáticos, parece que la práctica anaeróbica aumenta su concentración. De acuerdo con (Cazzola, Russo-Volpe, Cervato, & Cestaro, 2003), esta adaptación podría ser el resultado de la producción de RL repetida durante la isquemia reperusión y la inflamación causada por este tipo de ejercicio a nivel muscular.

### *2.11.1.3. Entrenamiento Mixto.*

Poca investigación se ha realizado en lo que a la influencia del entrenamiento mixto sobre el estrés oxidativo se refiere. Sin embargo, estudios recientes sugieren que los jugadores de fútbol o de rugby entrenados tienen un menor estrés oxidativo en comparación con los sujetos sedentarios (Cazzola, et al., 2003).

Otros estudios también muestran que los jugadores de fútbol y de rugby tienen un aumento del sistema enzimático antioxidante. Estos resultados son justificados tanto en sujetos atletas de élite como sujetos con un nivel inferior. El entrenamiento mixto, también aumenta la capacidad antioxidante total y algunos antioxidantes no enzimáticos, como vitamina C, vitamina E y ácido úrico (Cazzola, et al., 2003). Las mejoras del sistema antioxidante protegen a los jugadores de los efectos nocivos del estrés oxidativo. El aumento de la carga de entrenamiento y el aspecto competitivo, pueden causar el efecto

contrario tal y como se demostró en un estudio realizado a jugadores de baloncesto (Schroder, Navarro, Mora, Galiano, & Tramullas, 2001). Aunque se obtuvieron resultados contrarios en futbolistas de alto nivel, las diferencias podrían explicarse por el estado nutricional.

### **2.11.2. Relación entre la carga de entrenamiento y el estrés oxidativo**

Los marcadores de estrés oxidativo y del estado antioxidante pueden ser importantes parámetros en el seguimiento biológico. Muchos de los datos obtenidos se corresponden a un control biológico clásico de algunos deportes disponibles; diversos estudios están realizados sobre el seguimiento longitudinal de los marcadores de estrés oxidativo y estado antioxidante. Un seguimiento longitudinal de los ciclistas de alto nivel muestra un aumento significativo de GPX durante el período de entrenamiento y una reducción durante el período de recuperación. Además es importante señalar que los autores han observado una disminución de la actividad de la GPX y en la concentración plasmática de selenio durante el período de entrenamiento intenso. Así, mismo, un estudio realizado en futbolistas profesionales de América, sugiere que durante la temporada deportiva, puede observarse una disminución del sistema antioxidante y un aumento de estrés oxidativo (Schippinger et al., 2002).

Estos dos estudios podrían complementarse con otras investigaciones para obtener una mejor comprensión de la relación entre la carga de entrenamiento y estrés oxidativo. Aunque se basan principalmente en estudios que muestran que el estrés oxidativo puede aumentar durante un período de entrenamiento intenso.

Definitivamente, existen numerosos estudios que han demostrado que el entrenamiento mejora el estado antioxidante. Estos resultados pueden ser explicados por un aporte individual de antioxidantes básicos en la ingesta y una frecuencia de entrenamiento y competición que conduce a una movilización y a un uso adecuado de nuestros compuestos antioxidantes. Estos

resultados son confirmados por otros estudios en diferentes deportes y en varias poblaciones. Recientemente también se ha demostrado que una sobrecarga de entrenamiento compromete la defensa antioxidante, conduciendo a un aumento del estrés oxidativo inducido por el ejercicio.

### **2.11.3. Relación entre estrés oxidativo y sobreentrenamiento**

El objetivo de un programa de entrenamiento es optimizar al máximo el rendimiento individual y colectivo. Es difícil saber si el programa aplicado a los atletas está bien adaptado o conduce al estado de fatiga persistente, conocido como "sobreentrenamiento". Cuando se sobrepasa la capacidad de adaptación de un sujeto al entrenamiento que se le impone, sus sistemas orgánicos dejan de ser eficaces para afrontar nuevos esfuerzos, la fatiga se prolonga y se produce una grave disminución del rendimiento deportivo, acompañada de un conjunto de síntomas fisiológicos y psicológicos de agotamiento (Raglin & Morgan, 1987), que desemboca frecuentemente en el abandono de la práctica deportiva. Entre los síntomas psicológicos cabe destacar: depresión, apatía, perturbaciones del estado de ánimo, hiperreactividad al estrés, incremento de la ansiedad y la percepción del esfuerzo, así como autoestima reducida y dificultad para concentrarse (Fry, Morton, & Keast, 1991). Algunos autores utilizan el término Burn-out (estar quemado) para referirse a esta sintomatología producida por sobresolicitación, adoptando la definición de (Maslach & Jackson, 1981) quienes lo definieron como un síndrome tridimensional caracterizado por agotamiento emocional, despersonalización y reducida realización personal. Para facilitar la distinción entre el Sobreentrenamiento entendido como estímulo (período en el que se aumenta la carga de trabajo con el propósito de conseguir una mayor supercompensación) y el estado de fatiga crónica que resulta cuando el sujeto no consigue adaptarse, en adelante nos referiremos a este último estado como Síndrome de Sobreentrenamiento.

Los periodos prolongados de entrenamiento intenso de competición están a menudo asociados con una amplia variedad de cambios hormonales,

inmunológicos, hematológicos y bioquímicos, que si no son controlados de forma específica pueden llegar a generar esta situación en el deportista.

Las causas del Síndrome de Sobreentrenamiento son complejas y existen hipótesis divergentes basadas en suposiciones sobre fenómenos metabólicos, inmunológicos, estructurales e inflamatorios. Un período de entrenamiento intenso, como se ha descrito anteriormente, se asocia con una disminución en el estado antioxidante, y un aumento de la producción de EROs y un proporcional aumento del estrés oxidativo; aunque no hay evidencias directas, el aumento del estrés oxidativo puede estar involucrado en la aparición del sobreentrenamiento. Sin embargo, el daño celular, en particular a nivel muscular, podría ser un importante elemento explicativo del Sobreentrenamiento, vista la reducción de la capacidad metabólica de las células, la acumulación de lesiones musculares está asociada a un proceso de inflamación durante la reparación de los tejidos. Este proceso puede relacionarse con un aumento del estrés oxidativo causado por la producción de RL generada por los neutrófilos y macrófagos, en el proceso inflamatorio producido tras un entrenamiento intenso.

El exceso de ejercicio o sobreentrenamiento, el otro punto final de la curva de hormesis, aumenta el riesgo de enfermedad y pone en peligro la salud. De hecho, también está bien establecido que en condiciones de sobreentrenamiento el proceso de adaptación falla, y es principalmente debido a la recuperación incompleta de las series de ejercicio (Ogonovszky et al., 2005). Durante el ejercicio, el resultado metabólico, carga mecánica y psicológica en genera una alteración en un amplio abanico de órganos, y es necesario el periodo de reposo para que el cuerpo se recupere y compensa y/o supercompense, los efectos del ejercicio-estresante. Es un hecho fisiológico bien conocido, que el ejercicio debe alcanzar un cierto nivel de estrés para que la adaptación pueda ocurrir. En efecto, si el estrés inducido por el ejercicio no alcanza este umbral, la adaptación no se dará.

## CAPÍTULO II: Antecedentes Bibliográficos

Bajo nivel de carga de ejercicio puede ser eficaz en el caso de la aptitud física de bajo nivel, pero para individuos bien entrenados a alto nivel, el estrés de ejercicio es obligatorio.

La adaptación no se producirá sin fatiga. El nivel de fatiga es importante, ya que la fatiga extrema podría causar alteraciones celulares muy importantes, incluso los irreversibles, y el período de recuperación después de la fatiga extrema podría ser demasiado largo, lo que hace que sea difícil establecer un régimen de ejercicio. Por otro lado, si, después de la fatiga, la falta de tiempo para la recuperación no se contabiliza, puede darse el comentado Síndrome de sobreentrenamiento. Esto daría como resultado en resumen, una disminución del rendimiento fisiológico, una perturbación de los procesos hormonales, una función inmune deprimida, un aumento de la susceptibilidad a la infección, y un aumento de la incidencia de muchas enfermedades (Angeli, Minetto, Doviolo, & Paccotti, 2004; L. E. Armstrong & VanHeest, 2002; Nederhof, Lemmink, Visscher, Meeusen, & Mulder, 2006; L. L. Smith, 2003).

La inflamación, es un proceso de protección necesario para que el proceso de curación se produzca. Ésta puede ser excesiva y la generación y liberación de citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias pueden ser los factores causantes del síndrome del sobreentrenamiento (L. L. Smith, 2000). El sobreentrenamiento es un proceso de mala adaptación, que puede poner en peligro seriamente la salud y disminuir la capacidad de mantener homeostasis. No hay duda de que el sobreentrenamiento es un punto final de la curva de hormesis asociada al ejercicio.

En resumen, tanto el entrenamiento aeróbico, anaeróbico y como el mixto conducen generalmente a una disminución del estrés oxidativo, debido parece ser, a un aumento de la eficiencia del sistema antioxidante, sin conocer con certeza, si la mejora del sistema antioxidante, se debe a un cierto volumen de entrenamiento a largo plazo, a la ingesta de una determinada dosis de antioxidantes no enzimáticos o ambos a la vez.

Algunos estudios reportan una disminución de la eficiencia del estado antioxidante, especialmente en atletas de alto nivel que están sujetos a un entrenamiento importante, a una carga de competición y una dieta inadecuada. Así se ha demostrado también, que el síndrome de Sobreentrenamiento presenta una importante respuesta de marcadores de estrés oxidativo y que fue proporcional a la carga de entrenamiento. Se aclaró en un estudio donde doce varones fueron sometidos a un entrenamiento progresivo de resistencia de doce semanas, lo que sugiere que pueden servir como una herramienta de diagnóstico para el sobreentrenamiento (Konstantinos et al., 2007)

Cierto es, que el programa de entrenamiento debe ser lo suficientemente largo e intenso para provocar una respuesta adaptativa del sistema antioxidante y una disminución en el estrés oxidativo, siendo de especial relevancia cuando el nivel de entrenamiento de los sujetos es bajo al inicio del protocolo.

Aun así, la literatura sigue quedándose a las puertas de conocer qué volumen e intensidad es la que comienza a producir el efecto contrario en deportistas de alto nivel, sugiriendo que podría existir un límite a partir del cual, el estrés oxidativo puede incrementarse en exceso y causar finalmente un Síndrome de Sobreentrenamiento o un deterioro celular general.

## CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODO





## 3.1. Metodología y plan de trabajo

### 3.1.1. Sujetos experimentales

En el estudio participaron un total de 72 sujetos varones agrupados en tres grandes grupos en función del volumen de práctica deportiva semanal predominantemente aeróbica que realizan o han realizado a lo largo de su vida; a su vez, se subdividieron en 3 subgrupos según el rango de edad a continuación descrita:

**Grupo Sed. (Sedentarios):** 24 sujetos con estilo de vida sedentaria, reconociéndose ésta como la no realización de práctica deportiva con predominio aeróbico de forma esporádica y menor a 3 horas a la semana.

- **Subgrupo Sed-1:** 8 sujetos sedentarios de 18-25 años de edad.
- **Subgrupo Sed-2:** 8 sujetos sedentarios de 38-55 años de edad.
- **Subgrupo Sed-3:** 8 sujetos sedentarios de más de 55 años de edad.

**Grupo Rec. (Recreacionales):** 24 sujetos que realizan entre 5 y 8 horas semanales de práctica deportiva de carácter aeróbico y de modo recreacional desde los 18 años de edad y de forma continuada en los grupos 2 y 3.

- **Subgrupo Rec-1:** 8 sujetos recreacionales de 18-25 años de edad.
- **Subgrupo Rec-2:** 8 sujetos recreacionales de 38-55 años de edad.
- **Subgrupo Rec-3:** 8 sujetos recreacionales de más de 55 años de edad.

**Grupo Eli. (Élites):** 24 sujetos que son o han sido deportistas de élite-competición en modalidades aeróbicas y con una práctica deportiva semanal igual o superior a las 8 horas.

- **Subgrupo Eli-1:** 8 sujetos de 18-25 años de edad que entrenan de forma regular y compiten en pruebas de ámbito nacional/internacional en la categoría élite.
- **Subgrupo Eli-2:** 8 sujetos de 38-55 años de edad y que compiten a nivel máster 30 ó 40, en pruebas aeróbicas de ámbito nacional y que a edades más tempranas lo hacían en la categoría élite.
- **Subgrupo Eli-3:** 8 Sujetos de más de 55 años de edad han competido

en distintas categorías, élite, máster 30 y máster 40, y que siguen realizando actividad física aeróbica de forma ininterrumpida con un volumen igual o superior a las 10 horas semanales.

### 3.1.2. Criterios de selección

- **Criterios de inclusión:**

- Sujetos sanos.
- Entre los rangos de edades escogidas para los subgrupos de estudio.
- Iguales condiciones de práctica deportiva desde los 18 años hasta el momento del estudio, para los subgrupos de edades 2 y 3.
- Volumen de práctica deportiva predominantemente aeróbica dentro de los rangos establecidos semanalmente para cada grupo de experimental.

- **Criterios de exclusión:**

- Ingesta de suplementos antioxidantes (dieta exógena).
- Patología cardiaca.
- Patología pulmonar.
- Fumadores.

Los valores medios de edad, peso, estatura y de horas de práctica deportiva semanal de los sujetos experimentales se exponen en la tabla 12.

*Tabla 12. Medias  $\pm$ EEM de edad, peso corporal, estatura y horas de entrenamiento semanal, de los sujetos participantes en el estudio.*

Grupos	(n=72)	Edad (años)	Peso Corporal (kg)	Estatura (cm)	Práctica deportiva (horas/sem.)
Sed-1	8	23,71 $\pm$ 0,86	75,44 $\pm$ 1,69	179,29 $\pm$ 1,47	1,71 $\pm$ 0,44
Sed-2	8	49,25 $\pm$ 1,99 #	83,31 $\pm$ 4,50	170,50 $\pm$ 2,86	1,06 $\pm$ 0,43
Sed-3	8	58,50 $\pm$ 1,38 #	80,33 $\pm$ 3,98	171,33 $\pm$ 1,77	0,29 $\pm$ 0,16
Rec-1	8	22,38 $\pm$ 0,73	72,23 $\pm$ 3,09	178,13 $\pm$ 1,89	7,00 $\pm$ 0,53 &\$
Rec-2	8	47,50 $\pm$ 1,48 #	78,71 $\pm$ 2,77	172,20 $\pm$ 2,10	5,70 $\pm$ 0,42 &\$
Rec-3	8	60,78 $\pm$ 2,27 #	75,41 $\pm$ 1,63	169,11 $\pm$ 1,70	5,22 $\pm$ 0,43 &
Eli-1	8	24,00 $\pm$ 1,07	70,57 $\pm$ 2,89	175,36 $\pm$ 2,66	14,71 $\pm$ 0,84 &
Eli-2	8	45,75 $\pm$ 1,28 #	72,24 $\pm$ 3,51	174,88 $\pm$ 2,81	13,25 $\pm$ 0,98 &
Eli-3	8	60,71 $\pm$ 1,74 #	84,83 $\pm$ 2,44	176,43 $\pm$ 2,13	9,71 $\pm$ 0,68 &

Con anterioridad a las evaluaciones físicas pertinentes, cada uno de los participantes en la investigación recibió por escrito un informe con los objetivos y el procedimiento a seguir en el estudio, así como, una descripción de las pruebas a las que debía someterse, parámetros esenciales a seguir previos a la valoración y post valoración y tanto los riesgos como los beneficios de su participación en el estudio. Dicho informe fue rellenado por cada colaborador su conformidad tal y como marca la Declaración de Helsinki (52<sup>a</sup> Asamblea General. Edimburgo, Escocia: Organización Mundial de la Salud; 2000) y los lineamientos éticos internacionales para investigación biomédica con sujetos humanos del Concilio para Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS) celebrado en Ginebra: Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud; 2002. Añadir que este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Granada en curso 2010-2011.

### **3.1.3. Tipo de estudio y variables descritas**

Con estas condiciones nos enfrentamos a un estudio transversal cuasi-experimental con un diseño factorial mixto 3x3x2 y cuyas variables independientes fueron, tanto el volumen de práctica deportiva predominantemente aeróbica realizada a la semana a lo largo de su vida y hasta el momento de la investigación (grupos: sedentario, recreacional o élite), como la edad correspondiente de cada subgrupo (1, 2 ó 3) y la situación pre-post en las medidas valoradas tras el esfuerzo. Como variables dependientes se estudiaron el estrés oxidativo a nivel fisiológico (marcadores de estrés oxidativo y de daño muscular) y las respuestas antioxidantes consecuencia de las adaptaciones producidas según el volumen de práctica deportiva con predominio aeróbico realizada a la semana y el avance de la edad. Además se aplicó un diseño correlacional para establecer la relación actina-lactato tras prueba de esfuerzo, estableciendo grupos en función de las variables independientes.

### 3.1.4. Instalaciones para el desarrollo de la investigación

Para este estudio fueron combinadas varias instalaciones pertenecientes a la Universidad de Granada. El desarrollo de las valoraciones antropométricas y pruebas de esfuerzo a los sujetos se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Facultad de Ciencias De La Actividad Física y el Deporte de dicha Universidad. El posterior análisis de muestras y determinación de los parámetros bioquímicos, se desarrolló en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos perteneciente al Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada.

### 3.1.5. Procedimiento de la investigación

La investigación fue recogida en tres grandes fases:

- **Primera Fase: Recogida De Datos:** Esta primera etapa del estudio se dedicó a la evaluación de los sujetos; en dicha valoración se recogieron datos de composición corporal y parámetros fisiológicos y sanguíneos pre y post a una prueba de esfuerzo.
- **Segunda Fase: Análisis De Datos:** Seguidamente, las muestras sanguíneas extraídas en las evaluaciones fueron transportadas en hielo hasta el Instituto de Investigación Biomédica para su división y congelación. Posteriormente las muestras se analizaron para determinar los marcadores oxidativos escogidos para este estudio tal y como indica el siguiente esquema (Ilustración 19).
- **Tercera Fase: Tratamiento Estadístico:** En esta Fase se finalizó el procedimiento del estudio. Se realizó un análisis estadístico y gráfico de los datos obtenidos y se plantearon las comparaciones para justificar el objetivo de la investigación y determinar las conclusiones.

MARCADORES SANGUÍNEOS	Sangre	Marcadores	Parámetros
	Sangre	Rendimiento	Lactato Hematocrito
	Linfocitos	Marcadores de daño del ADN	Comet Assay
	Plasma	Marcadores de Estrés oxidativo de origen lipídico	Hidroperóxidos TBARs
		Antioxidantes no enzimáticos	Tocoferol ConzimaQ <sub>10</sub> Retinol
	Eritrocitos	Antioxidantes Enzimáticos	SOD Catalasa Glutation peroxidasa Glutation reductasa
Suero	Marcadores de daño sarcomérico	α-actina Troponina (cTnl)	

Ilustración 19. Esquema de análisis de marcadores sanguíneos relacionados con el estrés oxidativo de la investigación.

## 3.2. Material y métodos utilizados.

### 3.2.1. Análisis corporal. Valoración antropométrica

#### Protocolo: Valoración antropométrica.

El estudio de la composición corporal de los sujetos seleccionados acordó las normas y técnicas fundadas por el International Work Group of Kinanthropometry (I.W.G.K.) cuya metodología establecieron en nuestro país el Grupo Español de Cineantropometría (G.R.E.C.) (Aragónés, Casajús, Rodríguez, & Cabañas, 1993; ISAK, 2001). Se tomaron diecinueve medidas antropométricas entre las cuales destacamos peso, estatura, pliegues cutáneos, perímetros corporales y diámetros óseos. Las medidas se realizaron tres veces consecutivas calculándose la media de las mismas y tomándose ésta como valor nominal, y valorando el error técnico de medidas marcando previamente en el lado derecho del sujeto de estudio los puntos anatómicos de referencia según los criterios preconizados por el ISAK; siendo las mismas obtenidas por el mismo autor, cuyo error técnico de medida está dentro de los márgenes aceptados (2-5%).

Las medidas antropométricas tomadas fueron las siguientes: estatura, peso, pliegues cutáneos (bicipital, tricipital, subescapular, suprailíaco, abdominal, muslo y pierna medial), perímetros corporales (bíceps relajado, bíceps contraído, muslo y pierna) y diámetros óseos (biepicondilar del humero, biepicondilar del fémur y biestiloideo).

Una buena práctica antropométrica supone la utilización del error técnico de medición (TEM) para evaluar la consistencia, o la precisión, del medidor de una variable dada (Carter, J.E.L, 1984). El TEM se calcula aplicando la siguiente ecuación:

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

En nuestro estudio, la variación entre medidas para los pliegues cutáneos (TEM) fue menor del 2.29%, con una reproductibilidad determinada por un coeficiente de correlación “r” de 0.987. Para diámetros y circunferencias, la variación entre medidas fue inferior al 0.89% y con un “r” de 0.99.

**Material:** El material utilizado se compuso de: báscula digital marca Tefal de 130 kg/100g de precisión; tallímetro para adultos "T201-T4, ASIMED; set antropométrico compuesto de plicómetro, medidor de perímetros y cinta para mediciones de perímetros, Harpenden.

### Parámetros obtenidos en el Análisis Corporal

1. **Índice de Masa Corporal (IMC).** El Índice de masa corporal (IMC), o Body Mass Index en inglés (BMI), es un valor estima el grado de obesidad de un individuo en función de su peso y estatura. Es el resultado de un cálculo entre el peso medido en kilogramos, dividido por la altura medida en metros y elevada al cuadrado. El IMC recibe también el nombre de Índice de Quételet, ya que fue descubierto por el científico belga Jacques Quételet y expuesto por primera vez en 1835.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido este índice de masa corporal como el estándar para la evaluación de los riesgos asociados con el exceso de peso en adultos. Un alto IMC se asocia a mayor riesgo de muerte. La mortalidad hoy en día se encuentra a diversas causas como, patologías cardiovasculares, cáncer u otras enfermedades, y el riesgo aumenta a través del rango de sobrepeso de moderado a severo tanto en hombres como en mujeres.

2. **Cuatro Compartimentos Corporales.** Hemos abordado la metodología de los cuatro compartimentos descrita por de Rose y Guimares a partir de la ecuación de Matiegka a principios de 1980, que determina el tanto por ciento correspondiente a la masa muscular, masa grasa, masa ósea y masa residual, y que actualmente sigue siendo la más aplicada en la evaluación corporal, y especialmente en la de deportistas.
3. **Somatotipo:** Hemos seguido el método descrito por Heath and Carter (1990). El somatotipo es utilizado para estimar la forma corporal (morfología) y su composición, principalmente en atletas, capaz de ser comparado con datos ideales según su edad y nivel deportivo alcanzado. Lo que se obtiene, es un análisis de tipo cuantitativo del físico. Se expresa a través de una calificación que consiste en una cifra de tres dígitos. Estos números siempre se registran en el mismo orden y cada uno de ellos representa la evolución de uno de los tres elementos primarios del físico Endomorfo, Mesomorfo y Ectomorfo y así describe variaciones individuales dentro de la morfología y compostura humana (Villanueva, 1979). El componente Endomórfico representa la adiposidad en relación a la talla; el componente Mesomórfico representa la robustez o magnitud músculo- esquelética por unidad de altura; y el componente Ectomórfico representa la linealidad de los dos anteriores o delgadez de un físico en relación a la talla. El somatotipo es una descripción de la configuración morfológica actual o una predicción de los futuros y sucesivos fenotipos que una persona puede presentar siempre y cuando el factor nutricional sea constante.

### 3.2.2. Valoración del esfuerzo. Test submáximo incremental

#### Protocolo: Test de Esfuerzo Submáximo.

Tras la determinación de los parámetros antropométricos, se procedió a la realización de la evaluación física, y para ello, se llevó a cabo un procedimiento dividido en tres fases.

- **FASE 1: obtención de muestras sanguíneas y presión arterial pre-esfuerzo:** Se obtuvieron muestras sanguíneas de cada uno de los sujetos previas al esfuerzo físico tomadas de la vena anticubital que se conservaron en hielo para su posterior procesamiento. Así mismo, se recogieron valores de Presión Arterial pre-ejercicio mediante un tensiómetro manual.
- **FASE 2: prueba de esfuerzo:** Para la realización de la prueba de esfuerzo, teniendo en cuenta los objetivos del estudio, la inclusión de participantes sedentarios (no habituados a prácticas extenuantes) y la declaración de Helsinki, seleccionamos una prueba de esfuerzo submáxima en cicloergómetro y minimizar así el impacto mecánico en articulaciones en los sujetos sedentarios. La frecuencia cardiaca que debían alcanzar para dar por finalizado el test submáximo fue determinada mediante el cálculo indirecto de la misma. Aplicamos el concepto y cálculo de la **Reserva Cardíaca (RC):  $FC_{máx} - ppm$  en reposo** y se empleó la fórmula descrita por Karvonen y Vourimaa (1988);  **$FC_{entrenamiento} (\%) = (RC \times \% intensidad) + ppm$  en reposo**. La intensidad submáxima se estima para éste tipo de cálculos sobre el 80% de la RC. El cálculo previo e indirecto de la  $FC_{máx}$  fue realizado en base a la fórmula descrita por Gellish 2007 ( $207 - 0,7 \times edad$ ), obteniéndose así los valores más fieles de intensidad submáxima para cada subgrupo de edad y nivel de práctica deportiva. Teniendo en cuenta estos cálculos, el test se dio por concluido cuando el valor medio de la FC en los 20 segundos



previos al último escalón fue de 170 ppm para los grupos de inferior edad (Sed-1, Rec-1, Eli-1), de 160 ppm para los grupos de edad media (Sed-2, Rec-2, Eli-2) y de 150 ppm para los grupos de edad avanzada (Sed-3, Rec-3, Eli-3). La prueba se inició con un calentamiento a 75 vatios (450 kg.m.min<sup>-1</sup>) de 5 minutos de duración y seguido de 4 minutos de reposo. Acto seguido se procedió a la prueba de esfuerzo que fue incremental, con escalones de 25 vatios y de un minuto de duración, comenzando en todos los casos a una potencia de 75 vatios. Tras la prueba, se realizó una recuperación activa a igual carga de la inicial, de un minuto de duración. Durante la prueba, los sujetos fueron monitorizados para las distintas variables fisiológicas (Frecuencia Cardíaca) y ergométricas (cadencia de pedaleo, vatios y trabajo mecánico) a través software incorporado en el cicloergómetro utilizado (Cargirus Medical Pro, Madrid). Todas las pruebas se iniciaron a las 10 de la mañana.

- **FASE 3: obtención de muestras sanguíneas y presión arterial post-esfuerzo:** Justamente al minuto de recuperación, se volvieron a tomar muestras de presión arterial y sangre siguiendo el mismo método de la primera fase.

### Obtención de muestras biológicas.

Las muestras de sangre fueron distribuidas en sendos tubos, 5 ml en tubos con EDTA y 2 ml en tubos específicos para la obtención de suero. A cada sujeto se le tomaron dos muestras de sangre, una en reposo (antes de proceder al calentamiento y a la prueba de esfuerzo) y otra al minuto de concluir la misma.

La sangre fue rápidamente centrifugada para separar el plasma ó suero, a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 ° C. Los elementos formes que quedaron tras extraer y alicuotar el plasma, se conservaron a 4°C para el posterior aislamiento de glóbulos rojos y de linfocitos. Las muestras de glóbulos rojos

fueron lavadas con suero fisiológico en tres ocasiones y congeladas en criocontenedores específicos. Todas las muestras, suero, plasma, linfocitos y glóbulos rojos, fueron almacenadas a  $-80^{\circ}$  hasta el momento de proceder a la analítica.

Los parámetros bioquímicos plasmáticos (Ácido úrico, Creatinina, Albúmina, Glucosa, Triglicéridos, Colesterol Total, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL, GOT, GPT y GT) se midieron espectrofotométricamente en un Analizador Bioquímico BS-200 (Chemistry Analyzer, SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD), utilizando kits de la casa comercial Spinreact (Sant Esteve de Bas, Girona). Los parámetros determinados en sangre al concluir la prueba de esfuerzo fueron hematocrito y lactato (Lactate Pro, Carlton, Austria).

**Material:** Cicloergómetro, Cardgirus Medical Pro, Software Cardgirus Medical versión Windows XP, Bandas pulsométricas Polar, Tensiómetro digital Omro M10-IT, Medidor de lactato, Lactate Pro. Centrífuga Biocen, Ortoalresa, Reactivo de Drabking para Hemoglobina. Micropipetas Prolaine de Biogit, Micropipetas digitales Ependorf research pro de Physio Care.

### 3.2.3. Aislamiento de linfocitos. Centrifugación por gradiente

Protocolo: Centrifugación por gradiente.

La sangre con anticoagulante (heparina de litio) recolectada en las pruebas de esfuerzo se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y con frenado programado. Se retiró el plasma y posteriormente se extrajo la capa leucocitaria que se diluyó 1:1 en 3 ml de medio RPMI-1640. La mezcla fue resuspendida y alicotada en capas sobre 3ml de Histopaque-1077 y llevada a una nueva centrifugación a 1750 rpm durante 30 minutos, a  $20^{\circ}\text{C}$  y sin frenada programada. De la misma muestra, se aislaron eritrocitos realizándoles varios lavados en suero fisiológico. La mezcla centrifugada, dejó separada la capa de linfocitos entre los medios RPMI-1640 y Histopaque-1077, que fue alicotada en

4 ml del medio RPMI-1640 para centrifugar a 1750 rpm durante 15 minutos, a 20 °C y sin frenada programada. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 4ml de medio RPMI-1640 al 10% de SBF. La mezcla se llevó a otra centrifugación idéntica a la anterior. Se eliminó de nuevo la capa superior y se añadieron 500 µl de Mezcla Fría (SBF al 10% de DMSO) a cada muestra. El botón leucocitario se resuspendió y se alicortaron 200 µl de la mezcla en varias copias sobre tubos Eppendorf a -80°C para su posterior análisis. La extracción de suero se realizó de la segunda muestra sanguínea sin anticoagulante, mediante una centrifugación a 3500 rpm durante 4 minutos.

**Material:** Centrífuga Beckman modelo GS-6R, Centrífuga Eppendorf modelo 5804, Pipetas Pasteur, Micropipetas digitales Ependorf research pro de Physio Care, Tubos corning plastico 15 ml, Ependorf de 0,5 y 1 ml de Deltalab, Criobox, Cryo 1°C de Nalgene, Congelador -80°C Thermo Electron Corporation.

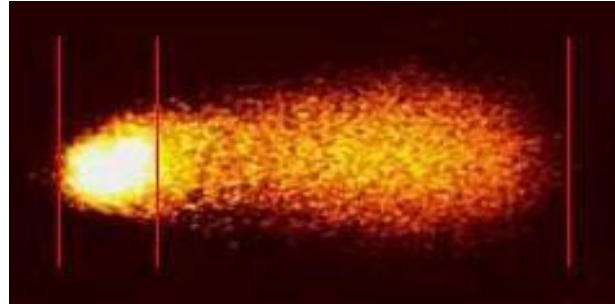
**Reactivos:** RPMI 1640, R7509 de Sigma, Histopaque-1077, 10771 de Sigma. Fetal Bovine Serum (SBF), F6765 de Sigma, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), D5879, de Sigma.

### 3.2.4. Determinación del daño oxidativo en el ADN de los linfocitos periféricos: Comet Assay Technique

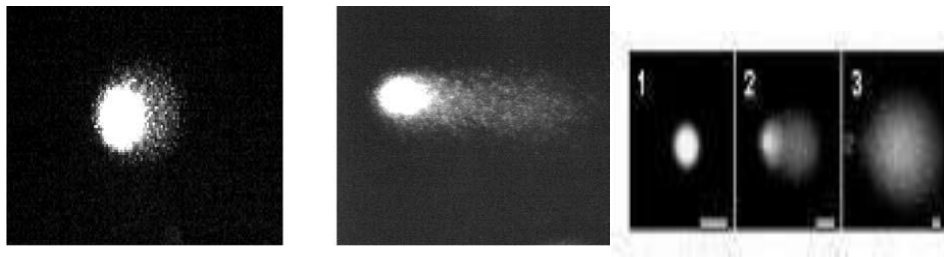
Se realizó la cuantificación del daño oxidativo en el ADN de las células leucocitarias periféricas mediante Comet Assay Technique, que realiza un análisis de la fragmentación de ADN asociados a la reparación de los daños nucleares, de acuerdo con el método de electroforesis en gel de células individuales.

La técnica Ensayo Single Cell Electrophoresis fue descrita por primera vez por Singh et al en 1988 y fue utilizado con éxito para medir los saltos de línea de ADN en las células (Collins y col., 1996). Las células de ADN en las que se han acumulado daños aparecen como cometas con una cola de DNA

fragmentado y descondensado (Ilustración 20), mientras que las células control (sin daño) tienen un núcleo esférico definido y denso (Ilustración 21).



*Ilustración 20. Imagen ADN linfocitario tintado, núcleo y ADN desfragmentado (Cola).*



*Ilustración 21. Diferentes niveles de estrés en el ADN linfocitario estudiado por Comet Assay.*

Tras finalizar la electroforesis y los baños de neutralización descritos en el protocolo, las muestras fueron tintadas con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). El ADN nuclear tiene una gran afinidad con este reactivo de tinción, lo que hace posible determinar parámetros de daño mediante su visión en microscopio. Los datos fueron analizados de forma cuantitativa y estadísticamente usando el software Komet 5.5. El Ensayo Comet es una técnica muy sensible al daño en el ADN de las células, pudiendo ser éste de carácter pasajero o con repercusiones en los procesos de envejecimiento

### Protocolo: Ensayo Cometa

Después del aislamiento, fueron utilizados 50 µl de linfocitos anteriormente aislados para la determinación del daño producido en su ADN. Las células se suspendieron en el 1% de agarosa de bajo punto de fusión (LMP agarosa) y en PBS, pH 7.4, mediante su alicota en diapositivas para microscopio que poseían una capa de 1% de agarosa normal punto de fusión (calentados a 37° C en un horno Memert un día antes de su utilización y enfriados a 8ª justo antes de su uso). Los portas con agarosa LMP permitirán la fijación de los linfocitos a 4°C en 5 minutos y, a continuación, éstos se sumergirán en una solución de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris a pH, 10, 1% Triton X-100 v / v) a 4°C durante una hora para eliminar las proteínas celulares. Tras este tratamiento las diapositivas se colocarán en un tanque que contiene buffer de electroforesis de NaOH 0,3 M y 1 mM EDTA, pH 10 a las 4°C durante 40 minutos para permitir la separación de las dos hebras de ADN (tratamiento alcalino). Seguidamente la electroforesis se realizará a 25 V, 300 mA y 50W durante 30 minutos.

Para culminar, las diapositivas se sometieron a tres lavados de 5 minutos cada uno, con una solución neutralizante (0,4 M Tris, pH 7,5) y se mantendrán a 4°C antes de la tinción con 1 mg / ml de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Los fragmentos de DNA de cada gel se examinarán bajo un microscopio UV con un filtro de excitación de 435 nm y un aumento de 400, modelo DMLS de Leica.

**Material:** Láminas para microscopio, Ca 76x26 mm de Menzel-glase, Láminas cobre objetos, 20x 20mm de Deltalab, Micotubos ependorf finos planos de 1,5ml de Deltalab, Micopipetas digitales, Ependorf Research Pro, de PhysioCare, Vortex, modelo autovortex mixer SA1, de Stuart Scientific, Agitador con calor modelo Magnetic stirrer MSH 300, de Boeco Germany, Medidor de pH modelo 510 de Instruments XS, Centrifuga Hettich modelo EBA 12, Baño modelo Unitronic-Or de Pselecta, Fuente de alimentación modelo Power PAC de BIO-RAD, Caja Comet para baños alcalinos y de neutralización, Balanza digital, modelo BP 110S, de Sartorius, Cubeta para electroforesis de Laborlan,

Microscopio UV, modelo DMLS de Leica, Software Komet 5,5 Kinetic Imaging para Windows Xp.

**Reactivos:** PBS (Phosphate buffered saline), Agarosas (High meelting Point (HMP) Y Low Meelting Point (LPM), EDTA 1M, NAOH (Hidróxido de Sodio), TRIS BASE, HCL 37% (ácido clorhídrico), NACL (Cloruro sódico), DMSO (Dimetil sulfuro), TRIBON X-100, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

### Parámetros obtenidos en Comet Assay Technique.

1. **% DNA HEAD o % de ADN en cabeza.** Determina el % deDNA existente en la parte de la cabeza de la célula y expresala intensidad de fragmentos de DNA disponibles en esta sección celular.
2. **% DNA TAIL o % de ADN en cola.** Determina el % de DNA existente en la parte definida como cola y se calcula restando100 - Head % DNA.
3. **CELL AREA O AREA DE LA CÉLULA:** número de pixeles de la imagen binaria de la cometa en total (incluyendo los pixeles que pertenecen a fragmentos de DNA).
4. **OLIVE TAIL MOMENT:** se define como el producto de la longitud de la cola y la fracción de ADN total en la cola. Este parámetro incorpora dos medidas en una, el tamaño mínimo detectable de la migración de ADN (que se refleja en la longitud de la cola del cometa) y el número de piezas de rotas (representado por la intensidad de ADN en la cola).

### 3.2.5. Determinación de marcadores de peroxidación lipídica: TBAR's e hidroperóxidos

#### 3.2.5.1. *Determinación de sustancias reactivas al Ácido Tiobarbitúrico en plasma (TBAR's)*

La peroxidación lipídica, consecuencia del estrés oxidativo, se estimó a través de la determinación de la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR's), medidas como equivalentes de malondialdehído (nmol/L). El método se basa en la reacción entre el malondialdehído plasmático, un producto de la peroxidación lipídica y el Ácido Tiobarbitúrico (TBA). Los resultados se expresan en nmol/L de TBAR's.

Se ha empleado el método de Orrenius S, et al (1977), el cual se basa en la medición espectrofotométrica de las sustancias que reaccionan con el TBA. El malondialdehído se encuentra en el segmento final de la oxidación lipídica y reacciona con el TBA formando un pigmento rosa. Se trata de una reacción no específica pero muy sensible, de forma que es necesario hacer una precipitación previa de las proteínas de la muestra. Se procesa, por tanto, la reacción de una molécula de MDA con dos moléculas de 2-tiobarbiturico TBA. Como la reacción es inespecífica se habla de sustancias que reaccionan con el TBA.

**Material:** Micropipetas automáticas ependorf, Placas de 96 pocillos para espectrofotómetro multiplacas Synergy HT Biotek, Incubadora para placas Elmi modelo Saaker Thermostat, Espectrofotómetro de multiplacas Synergy HT Biotek, Programa Informático para espectrofotometría Gens5.

**Reactivo:** TBA al 0,8%, Ácido acético al 20%.

#### Protocolo Determinación de sustancias que reacción al TBA.

Se ha partió de 50 ul de plasma los cuales se ha adicionado 75 ul de ácido tiobarbitúrico al 0,8% y 75 ul de acético al 20% en agua. Se

agitó y se incubó la placa a 60 C° durante una hora después se enfrió rápidamente en hielo picado hasta temperatura ambiente.

La reacción de MDA-TBA da lugar a una pigmentación anaranjada que se lee espectrofotométricamente en un microplacas de fondo en U a 532 nm.

### ***3.2.5.2. Determinación de la concentración plasmática de hidroperóxidos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).***

La medición de hidroperóxidos es una prueba que permite evaluar, en una muestra biológica, la concentración de hidroperóxidos (ROOH). Tales compuestos son generados en las células por el ataque oxidativo de las especies reactivas del oxígeno, en varios sustratos orgánicos y tras reaccionar con una sustancia cromógena, desarrolla un derivado coloreado, detectable y cuantificable mediante un espectrofotómetro. Los hidroperóxidos han sido cuantificados en plasma por el método xilenol-orange en fase acuosa y lipídica, este método está basado en el principio de la oxidación de los hidroperóxidos del hierro II a hierro III, los cuales reaccionan con el xilenol orange, produciendo un cromóforo de absorción máxima a 560nm.

#### **Protocolo: Determinación de la concentración de Hidroperóxidos en plasma.**

Seguimos los pasos del protocolo definido en el Kit adquirido (Kit Sigma: Peroxide Detect Kit for the Determination of Aqueous and Lipid Hydroperoxides), partiendo de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% (~ 9,8 M) reactivo incluido en el Kit (Código del Producto H9533). Diluimos para preparar una solución 10 mM y determinamos la concentración exacta de Hpx mediante una medición espectrofotométrica a una absorbancia de 240 nm que en una solución de 10 mM =0.436. Diluimos de nuevo hasta adquirir una solución 1mM, y 10 veces más hasta obtener otra 100 Mm. La reacción es línea de 1 a 7 nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por volumen de reacción. Seguidamente preparamos el Reactivo de trabajo de Color para hidroperóxidos en solución acuosa mezclando 100 volúmenes de Reactivo de color acuoso con 1 volumen de reactivo de sulfato de amonio ferroso. Una vez



### CAPÍTULO III: Material y Método

dispuestos los reactivos de trabajo, preparamos la curva patrón de densidad óptica usando agua desionizada y reactivo de trabajo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para poder determinar más tarde la relación de concentración de HPx (tabla 13).

100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Solution (µl)	nmoles per reaction volume
0	0
10	1.0
20	2.0
40	4.0
60	6.0
80	8.0

Tabla 13. Relación de concentración de Hidroperóxidos.

Añadimos 50 µl de muestra plasmática en el pocillo determinado y finalmente, cargamos 200 µl de Reactivo de Color en todos los pocillos de la placa. Agitamos e incubamos la placa, 250 rpm a 25°C (T<sup>a</sup>. A) durante 30 minutos. Seguidamente se procedió a la lectura de la misma en el espectrofotómetro de microplacas a 560 nm de longitud de onda y mediante el software Gens5. Los datos se expresaron en nmol/ml de plasma mediante la curva patrón con peróxido de hidrogeno descrita anteriormente.

**Material:** Pipetas electrónicas ependorf: 50, 75 y 200 µl, Microplacas Falcon 300µl Ref. 675801 Greiner Bio-one, Incubadora para placas Elmi modelo Saaker Thermostat, Espectrofotómetro de multiplacas Synergy HT Biotek, Medidor de pH modelo 510 de Instruments XS.

**Reactivos:** Kit Sigma (Peroxide Detect Kit for the Determination of Aqueous and Lipid Hydroperoxides).

### 3.2.6. Antioxidantes Enzimáticos.

Los antioxidantes pueden ser clasificados según su estructura molecular en enzimáticos y no enzimático, y se encuentran activos en nuestro organismo (antioxidantes endógenos). El control enzimático se produce por la acción de las enzimas dependientes de iones y metales (Cu, Mn, Se y Zn) como son las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutación Reductasa (GRx) y Glutación Peroxidasa (GPx).

Los antioxidantes enzimáticos constituyen el primer mecanismo de protección de la defensa antioxidante contra los radicales libres impidiendo su formación, principalmente actuando como inhibidores de las reacciones en cadena (Ilustración 22) con el hierro y el cobre. Las enzimas son capaces de interceptar los radicales libres generados por el metabolismo celular o por fuentes exógenas impidiendo el ataque sobre lípidos de las membranas, aminoácidos de las membranas y las bases del ADN, evitando la formación de lesiones y luchando por la integridad celular (Pires, M & Gregg L; 1999).

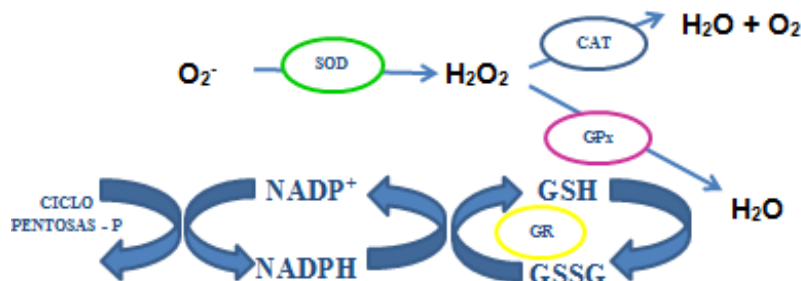


Ilustración 22. Esquema general de las reacciones de los principales antioxidantes enzimáticos.

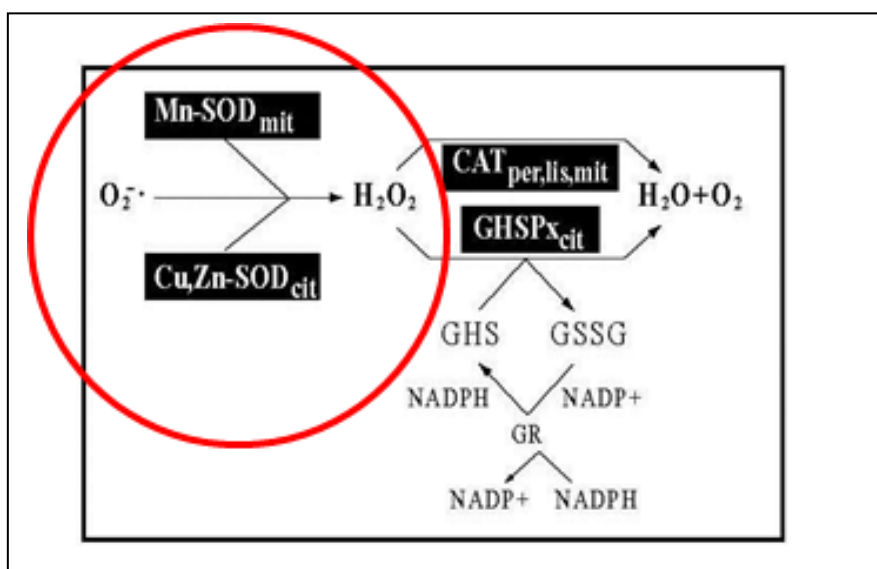
#### 3.2.6.1. Enzima superóxido dismutasa (SOD).

La enzima superóxido dismutasa es la primera vía de defensa antioxidante a nivel celular, actúa sobre la primera línea de ataque de la cadena de las EROs (Ilustración 23) . Su acción es catalizar la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno.

Reacción química:



Reacción fisiológica:



*Ilustración 23. Actuación de la enzima SOD dismutación del oxígeno singlete. Tomado de: Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia, AMC, vol 50 (4), octubre-diciembre 2008.*

### Protocolo: Determinación de la actividad de la enzima SOD.

Para la determinación de la actividad de la enzima SOD, nos ceñimos a la técnica descrita por Fridovich et al., 1975, ligeramente modificada, donde una Unidad de SOD se define como la cantidad de SOD que disminuye la velocidad de reducción del CC en un 50% en un sistema de Xantina- Xantina Oxidasa, en el medio determinado por las condiciones de los reactivos que define dicha técnica. El sistema X-XO, parte de la reducción de X, a XO produciendo ácido úrico y radical superóxido. Éste Radical, reduce a su vez al CC, tal y como muestra la Ilustración 24.

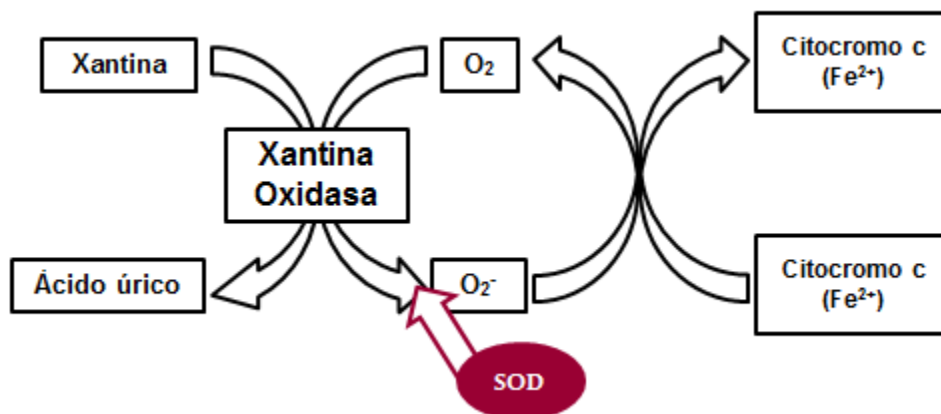


Ilustración 24. Sistema Xantina - Xantina Oxidasa.

Para conocer la cantidad de XO necesaria para la reducción del CC al 100%, preparamos una placa probando diferentes cantidades de ella, trabajando con los reactivos del medio tal y como define la técnica. Preparamos el Buffer de trabajo Carbonato/bicarbonato relación 1:1.25 (v/v), se llevó a pH 10 y se añadió EDTA 1 Mm. Utilizamos 30  $\mu$ l CC 0,1 M, 30  $\mu$ l de Xantina 0,5 mM y por último dispusimos la Xantina Oxidasa 0,2 U/ml. Añadimos en cada pocillo de la placa de estudio 30  $\mu$ l de CC, 30 $\mu$ l de Xantina, la cantidad de XO que pertenezca en esa columna y el resto de buffer hasta ajustar a un volumen final de 250  $\mu$ l. Lo último en añadir fue la XO que es la desencadenante de la reacción química. Se realizó una lectura de 3 minutos con intervalos de 15 segundos, a 550 nm, previa agitación de 20 segundos en el microplacas. Se escogió aquella cantidad de XO que produjo un aumento de absorbancia entre 0,025 y 0,05, y estando más próximo a 0,025.

Una vez conocida la cantidad de XO que reduce al CC al 100%, utilizamos ésta con patrón a seguir y se realizó el ajuste de reactivos en los pocillos según éste volumen. Para conocer la actividad de la SOD en nuestras muestras, añadimos 30  $\mu$ l de Xantina, 30  $\mu$ l CC y relación Buffer- muestra con 30  $\mu$ l de Xantina Oxidasa. Ésta fue añadida en último lugar ya que es la responsable de desencadenar la reacción química, como se citó anteriormente. Una vez añadida, se procedió a la rápida lectura a 550nm, 25°C, durante 3 min con intervalos de 15 segundos.

**Material:** Micropipetas electrónicas ependorf, Microplacas Falcon para luz

ultravioleta (240 nm), Espectrofotómetro de multiplacas Synergy HT Biotek, Medidor de pH modelo 510 de Instruments XS.

**Reactivos:** Buffer Carbonato:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Buffer bicarbonato:  $\text{NaHCO}_3$ , Xantina, Citocromo C, Xantina Oxidasa.

### 3.2.6.2. *Enzima catalasa (CAT).*

La técnica utilizada siguió el método descrito por Hugo Aebi (Aebi H, 1984). Previamente al estudio de la actividad de la enzima catalasa, fue medida la concentración de hemoglobina por el método de Drabkins's, llevando las muestras a una concentración de hemoglobina de 1 g/L en agua.

#### Protocolo: Determinación de la actividad de la enzima Catalasa.

La muestra de glóbulos rojos fue diluida 100 veces para tomar definitivamente en el estudio, 10  $\mu\text{l}$  de la misma. La actividad de la enzima fue determinada mediante la reacción cinética de la catalasa analizada en un espectrofotómetro. La descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue seguida directamente por la disminución en absorbancia a 240 nm ( $\epsilon_{240} = 0,00394 \pm 0,0002$  kiteros  $\text{mmol}^{-1}$ ). La diferencia en absorbancia ( $\Delta A_{240}$ ) por unidad de tiempo es la media de la actividad de la catalasa.

Fue preparado en primer lugar el Buffer Fosfato 50 mM a un pH 7.0. A continuación se elaboró el peróxido de hidrógeno a una concentración de 30mM para su reacción con la enzima catalasa. Una vez elaborada la placa, a cada muestra se le adicionaron 152  $\mu\text{l}$  de Buffer fosfato y se llevó a agitación durante 4min a 250 rpm y  $T^a$  ambiente. Se introdujo en el microplacas y justo antes de su lectura a 240nm mediante el software Gens5, se le añadieron 83  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM para observar la disminución de densidad óptica y así poder determinar la actividad de la enzima catalasa. Para determinar la actividad de la enzima se utilizaron las siguientes expresiones:

Actividad específica:

$$k = (2.3/15) (\log A1/A2) = 0,153 (\log A1/A2) (\text{sec}^{-1})$$

Para el cálculo de k/ml o k/g Hb:

$$k/ml = k a$$

$$k/g \text{ Hb} = k/ml(1000/b) = 2.3/15 (a/b) (\log A1/A2) (\text{sec}^{-1})$$

**Material:** Micropipetas electrónicas eppendorf, Microplacas Falcon para luz ultravioleta (240 nm), Espectrofotómetro de multiplacas Synergy HT Biotek.

**Reactivos:** Buffer fosfato 50 Nm, Peróxido de Hidrógeno (30 nM).

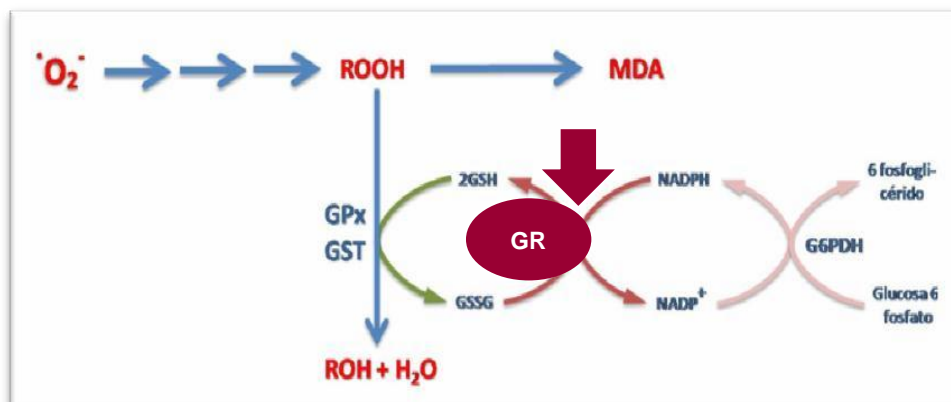
### 3.2.6.3. *Enzima glutation reductasa (GR).*

Esta enzima es la responsable de transformar el Glutati3n (GSH) que se encuentra casi de forma exclusiva en estado reducido en el organismo a Glutati3n Oxidado (GSSG). Es una reacci3n dependiente del NADPH (Ilustraci3n 25).

Reacci3n qu3mica:



Reacci3n Fisiol3gica:



Ilustraci3n 25. Esquema de la reacci3n fisiol3gica GR-GPx.

### Protocolo: Determinación de la actividad de la enzima Glutation Reductasa.

Técnica basada en el método de Inger Carlberg y Bengt Manervick (1975), donde la oxidación del NADPH es analizada en espectrofotómetro a 340 nm durante 5 min y a una temperatura de 30°C. Primero se preparó el tampón fosfato 0,1 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$  Y EDTA/ Bicarbonato 1% ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ), ajustado a pH 7, después se mezcló el tampón con los reactivos  $\text{NADPH}_2$  y GSSG, y se incubó a 37°C durante 5 minutos.

Añadimos 20  $\mu\text{l}$  de muestra de citosol (dilución 1:100) en microplacas falcon de 150  $\mu$  y la cantidad restante, 130  $\mu\text{l}$  del reactivo. Debido a la rápida reacción del NADPH, se procedió inmediatamente a la lectura en espectrofotómetro.

**Material:** Micropipetas automáticas ependorf, Placas de 96 pocillos Falcom, Incubadora para placas Elmi modelo Saaker Thermostat, Espectrofotómetro de multiplacas Synergy HT Biotek, Programa Gens5.

**Reactivos:** PBS (Phosphate Buffer Saline), EDTA 1M, NADPH (Sigma, N8129, 100mg), TRIS (Sigma, T1503, 100g), GSSG (Sigma G4376, 250mg).

#### *3.2.6.4. Enzima glutation peroxidasa (GPx).*

La enzima glutación peroxidasa, tiene como principal función la protección del organismo del efecto degradante de los hidroperóxidos; actúa en la eliminación del peróxido de hidrogeno de las células ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y su transformación en  $\text{H}_2\text{O}$  (Ilustración 26). En esta reacción el glutación reducido (GSH) es convertido en su forma oxidada (GSSG), pero luego es revertido nuevamente a GSH por la acción de la glutación reductasa (GR). Esta enzima utiliza el NADPH como sustrato y la flavina adenina dinucleotideo (FAD) como cofactor.

Reacción química:



Reacción fisiológica:

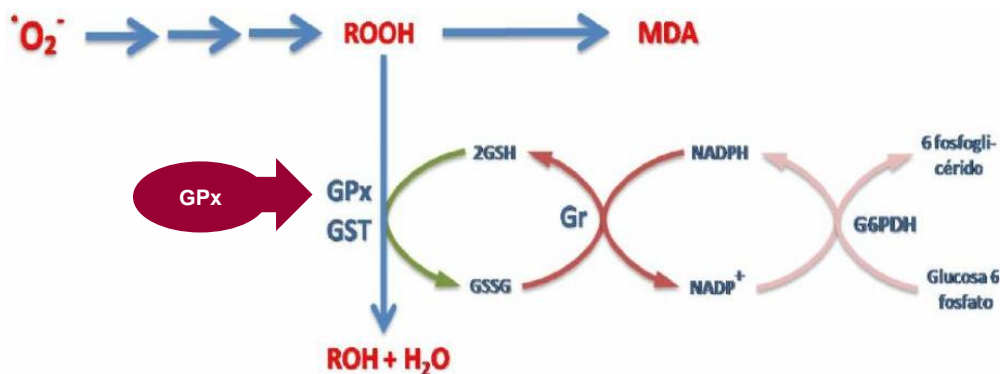


Ilustración 26. Esquema de la reacción fisiológica de la enzima GPx.

Protocolo: Determinación de la actividad de la enzima Glutation Peroxidasa.

Empleamos La técnica basada en el método descrito por Flohé y Wolfgang (1984) ligeramente modificado. En cada cubeta de microplaca de 150  $\mu\text{l}$ , fueron utilizados 56  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato potásico PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 pH 7,0) conteniendo EDTA 0,1mM, 19  $\mu\text{l}$  de GSH 99% en  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, 19  $\mu\text{l}$  glutatión reductasa y 18  $\mu\text{l}$  de muestra (citosol diluido 1:100), fueron encubado a 37°C durante 10min.

En espectrofotómetro en protocolo GEN 5, añadimos 19  $\mu\text{l}$  de NADPH 1,5 Mm en 0,1% de  $\text{NAHCO}_3$  para la primera monitorización de la reacción química independiente del hidroperóxido durante 3 min a 340 nm; en seguida se añadió 19  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% para la segunda monitorización completa de la reacción enzimática a 340 nm durante 5 min.



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

**Material:** Micropipetas automáticas ependorf, Placas de 96 pocillos Falcom, Incubadora para placas Elmi modelo Saaker Thermostat, Espectrofotómetro de multiplacas Synergy HT Biotek, Software Gens5.

**Reactivos:** GSH (Glutathione reduced 99%) de Sigma, Glutathione reductase de Sigma, NADPH de Sigma,  $\text{NaHCO}_3$  de Sigma,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de Sigma, EDTA de Panreac.

### 3.2.7. Antioxidantes no enzimáticos. Extracción y determinación de ubiquinona, betacaroteno, retinol y vitamina E por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Previo al análisis por HPLC, las muestras de plasma fueron tratadas para la extracción de antioxidantes, basándose en el método descrito por Kroger y Klingenberg (1978).

Protocolo: Extracción y determinación de antioxidantes no enzimáticos.

La ubiquinona Q10,  $\alpha$ -tocoferol, vitamina E y betacaroteno fueron extraídos utilizando una mezcla de metanol (Éter de petróleo 60:40).

Para las extracciones partimos de una mezcla en tubos de cristal de 250 $\mu\text{l}$  de SDS y 250 $\mu\text{l}$  de muestra (plasma), 1ml de (etanol: isopropanol) y 2,5ml de hexano, después de 1 minuto de agitación (con intervalos de 10seg), centrifugamos a 1500rpm a 4°C durante 15 minutos.

Con pipetas de vidrio capilarizadas eliminamos la capa superior, añadimos 2,5 ml de hexano y volvimos a centrifugar. Extrajimos el sobrenadante y pusimos las muestras en el vaporizador. Finalmente quedó un botón anaranjado de antioxidantes que se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

En el momento del análisis, seguimos el método de Battino y col (2001), para la determinación de antioxidantes mediante separación cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. Se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de éter puro en el tubo resuspendiendo el botón seco para su posterior análisis, pinchándose 120 $\mu\text{l}$  de esta suspensión en HPLC y consiguiéndose así la separación cromatográfica.

La fase móvil empleada fue una mezcla de etanol para HPLC y agua bidestilada en proporción 97:3 (aire fue retirado con una bomba de vacío), siendo la velocidad de flujo de 1ml/minuto y la duración del método de 25 minutos. También se utilizó un inyector automático Waters <sup>TM</sup> 717 plus Autosampler (Gen Tech Scientific, NY, USA). Las imágenes fueron analizadas emitiendo cromatogramas (Ilustración 27) que posteriormente fueron cuantificados.

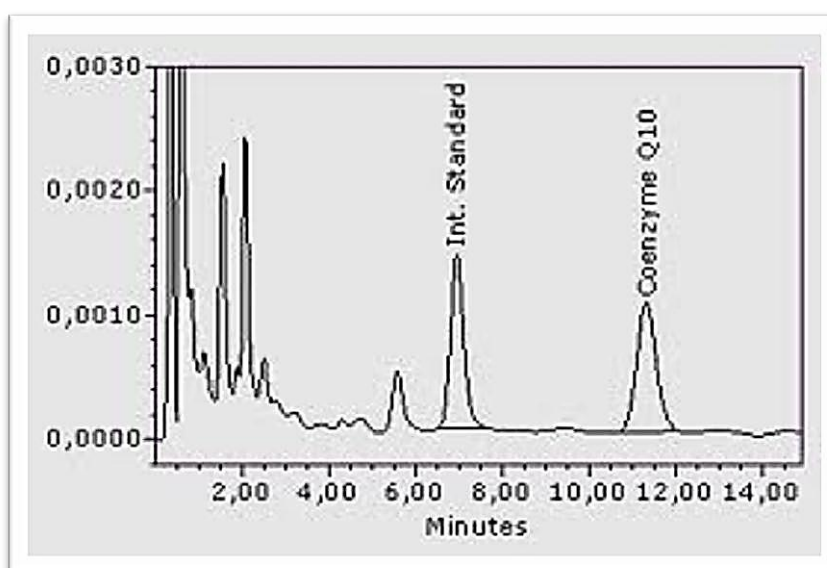


Ilustración 27. Cromatograma de Coenzima Q<sub>10</sub>.

**Material:** Columna Spherisorb S5 ODS I de 18 x 0,46 cm con una precolumna de igual relleno, Bekman Gold System equipado con un detector Diode array 168 y un horno de columna (Beckman) para garantizar que todos los análisis se realizan a 22°C. Pipetas de vidrio y pasteur, Tubos de cristal y plástico, Eppendorf y tapas de HPLC, Pipetas electrónicas Eppendorf de 500µ, 1000µ.

**Reactivos:** Panreac SDS (Laurilsulfato sódico 20g/1l), Ethanol absoluto, n-Hexane 95%, 2-Isopropanol.

### 3.2.8. Marcadores de daño sarcomérico

#### 3.2.8.1. Cuantificación de la proteína $\alpha$ -actina.

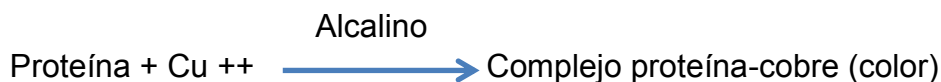
La actina es una de las dos proteínas que más abundan en el músculo y puede llegar a representar el 20% total de proteínas celulares (Aránega y col., 1990). Concentraciones elevadas de la misma en suero puede expresar daño de carácter sarcomérico o cardíaco producido en este caso por el estrés generado según la relación de volumen- intensidad de práctica deportiva.

#### Protocolo: Cuantificación de la proteína $\alpha$ -actina.

La técnica utilizada fue descrita por primera vez por Towbin y cols. (1979). Esta técnica está llevada a cabo en varios pasos o etapas. En primer lugar se realizó la **determinación de proteínas totales**. Se ha realizado en un autoanalizador SYNCHRON Cx4 (Beckman Instruments) mediante el método de Biuret a punto final regulado. Durante la reacción, los enlaces peptídicos en la muestra de proteína se ligan a los iones cúpricos, en un medio alcalino, para formar complejos peptídicos.

El sistema SYNCHRON Cx4 suministra automáticamente el volumen necesario de muestra y de reactivo en la cubeta. La proporción utilizada es una parte de muestra por cada 50 partes de reactivo. El sistema controla la velocidad de cambio de la absorbancia a 560 nm. El cambio de absorbancia es

directamente proporcional a la concentración de proteína total en la muestra y es utilizado por el sistema SYNCHRON Cx4 para calcular y expresar la concentración de proteína total.



En segundo lugar, procedimos a determinar la cantidad de  $\alpha$ -actina. La determinación de alfa actina sarcomérica se realiza por medio de la técnica de Western-Blott.

Los anticuerpos que hemos utilizado han sido los siguientes:

#### Ac Primario

Anticuerpo monoclonal (Ig M, kappa) de ratón anti Actina sarcomérica de conejo, Clone alfa-Sr-1 (Santa Cruz Biotechnology, INC).

#### Anticuerpo Secundario:

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

El protocolo de Western-Blott utilizado es el siguiente:

#### Preparación de las muestras

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

Volumen inicial x Concentración inicial = Volumen final x Concentración final			
( $\mu$ l)	(mg/ml)	(500 $\mu$ l)	(1 mg/ml)

### CAPÍTULO III: Material y Método

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

Una vez obtenida la proteína, se procedió a la electroforesis de las misma en gel de poliacrilamida 60  $\mu$ g de proteína se mezclaron en un eppendorf con loading buffer. Los eppendorfs se mantuvieron a 100°C durante 5 minutos en un termobloque. Como marcador proteico se usó medio y alto peso molecular de Sigma. Las muestras se cargaron en gel de poliacrilamida (12,5% resolving y 4% stancking gel), y se procedió a la electroforesis a 200 v durante 50 minutos.

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la transferencia en semdry utilizando un sistema Semy-Dry Transblot SD (Bio-Rad, CAUSA), desde el gel a una membrana de PVDF. La transferencia se realizó a 15 v durante 30 minutos. Para disminuir la fijación inespecífica de anticuerpos, la membrana fue bloqueada 2 veces durante 30 minutos con una solución de leche semidesnatada en polvo al 5% en un tampón TTBS a T<sup>a</sup> Ambiente y agitación, y posteriormente, incubada toda la noche con las diluciones correspondientes de cada anticuerpo primario a 4°C. Después se lavó la membrana con tampón TTBS a T<sup>a</sup> Ambiente, y en agitación. Posteriormente, se usó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido en buffer de bloqueo 1 hora también a T<sup>a</sup>A., y en agitación. Tras la unión del segundo anticuerpo, se lavó la membrana con TTBS y TBS.

Finalmente, se procedió a la detección de la proteína mediante quimioluminiscencia. La intensidad de las bandas fue medida por análisis de imagen, seguido por una densitometría cuantitativa.

El análisis densitométrico se realizó mediante el escaneado de las imágenes obtenidas por radiografía a partir de las membranas. En las imágenes digitalizadas aparecían 10 pocillos, de los cuales uno de ellos, pertenecía al control positivo (actina pura), y otro al peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range, Bio-Rad), quedándonos así 8 pocillos para las muestras de los sujetos analizados. Mediante el software Quantity One 1-D Analysis Software (BIO-RAD), se realiza la comparación entre los distintos pocillos, referidos al control positivo, al cual le damos un valor absoluto determinado y calculado. Así se calcularon los valores absolutos de la alfa actina en todas las muestras procesadas.

#### Cuantificación de $\alpha$ -actina a nivel absoluto

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

Para obtener la curva estándar cargamos actina pura en diferentes proporciones (Tabla 14) junto con el peso molecular, para comprobar que la banda de la actina coincide con su peso molecular. Partimos de una proporción inicial de 99  $\mu$ l de S.B (solución que se añade a la muestra) y 1  $\mu$ l de actina pura, siendo este el 100 % de la carga que vemos reflejado en la tabla 14.

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

Tabla 14. Diferentes concentraciones de Actina.

Una vez realizada la recta de concentración de actina, ya podemos conocer la cantidad absoluta de actina que contiene cada sujeto. Para ello en

## CAPÍTULO III: Material y Método

cada gel ponemos un control positivo (0,16  $\mu\text{g}/\mu$  de actina pura), con una cantidad conocida de actina, y en función a esa banda cuantificamos las demás, obteniendo así valores absolutos (Ilustraciones 28 y 29).

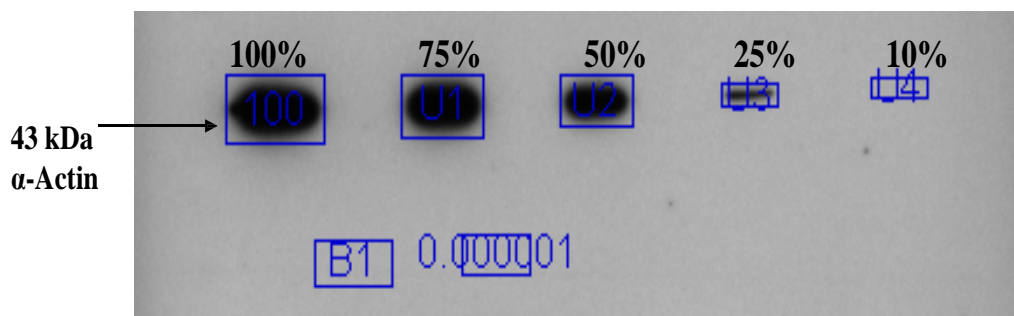


Ilustración 28. Concentración en % de Actina en diferentes concentraciones.

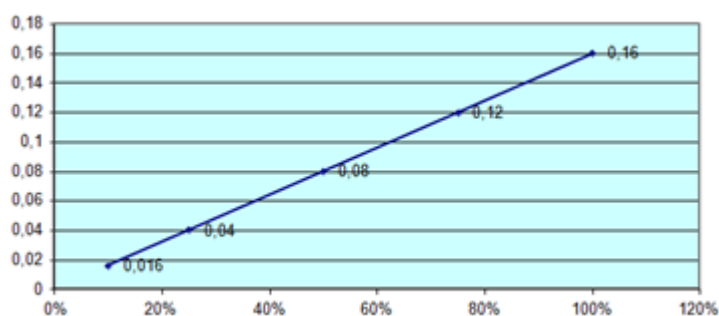


Ilustración 29. Recta de concentración de actina.

**Material:** Microcentrífuga, Zentrifigen Hettich EBA 12, MO, USA, Cubeta para electroforesis, Fuente de Alimentación, Power Basic, Bio-Rad, CA, USA, Eppendorfs (1,5, 1 y 0,5) ml, Termobloque, Labnet International, INC, NJ, USA, Sistema de transferencia de membranas, Semy-Dry Transblot SD, Bio-Rad, CA, USA, Membranas de PVDF, Immobilon, Milipore, Agitador Oscilante Mini See-Saw Rocker SSM4, Sistemade quimioluminiscencia, Amersham ECL PlusTM GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA, Sistema de análisis de Imagen, Molecular Dynamics, Software densitometría cuantitativa Image Quant.

**Reactivos:** PMSF, Coktail Inhibidor de proteasas, Gel de poliacrilamida, Marcador proteico Actina pura, Peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range, Bio- Rad), Membrana de PVDF, Anticuerpo monoclonal

(Ig M, kappa) de ratón anti Actina sarcomérica de conejo, Clon alfa-Sr-1 (Santa Cruz Biotechnology, INC), Goat anti-mouse Ig M (molécula completa) conjugado con peroxidasa de rábano picante tipo VI (Santa Cruz Biotechnology, INC), Leche semidesnatada en polvo 5%, Tampon TTBS.

### ***3.2.8.2. Determinación de la isoforma Troponina I.***

La isoforma cardíaca de la troponina I se determinó en suero por inmunoensayo (quimiofluorescencia) utilizando la técnica descrita previamente por Amat y col. (2005). Para ello se utilizó un ensayo inmuno-enzimático de tipo sándwich (Beckman Instruments). Las muestras de suero se añadieron a un recipiente de reacción de vidrio con fosfatasa alcalina conjugada que contenía anticuerpos monoclonales anti-troponina I, junto con partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-troponina I. De esta forma, la troponina cardíaca y se une a los anticuerpos en la fase sólida, mientras que los anticuerpos-fosfatasa alcalina conjugados reacciona con diferentes sitios antigénicos de la Troponina cardíaca. Después de la incubación, se eliminan los materiales no unidos a la fase sólida mediante separación en un campo magnético y lavado. Seguidamente se añade el sustrato quimioluminiscente, Lumi-Phos 530, al recipiente de reacción y se procede a la medida de la luz emitida por la reacción en un luminómetro. La producción de fotones es inversamente proporcional a la cantidad de conjugado enzimático presente al concluir la reacción y, en consecuencia, a la concentración de Troponina I cardíaca contenida en la muestra. La cantidad de esta molécula se determinó utilizando una curva de calibración.

## **3.3. Tratamiento Estadístico.**

Las determinaciones bioquímicas, han sido realizadas por duplicado, dando como valor la media de las dos determinaciones. Los datos presentados en tablas y figuras representan la media  $\pm$  error estándar de la media.



## CAPÍTULO III: Material y Método

Para comparar los valores medios se ha empleado un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Previamente se estudió la normalidad de las variables dependientes por el método de Kolmogorov- Smirnov y la homogeneidad de la varianza por el método de Levene. Las diferencias entre grupos ( $P < 0.05$ ) se establecieron utilizando el test “a posteriori” (post-hoc) de Tukey para varianzas homogéneas y T2 de Tamhane para varianzas no homogéneas.

Para estudiar la relación entre actina y lactato, se hicieron las correspondientes regresiones. En todos los casos se probaron secuencialmente distintos modelos de ajuste hasta encontrar el de mayor “ $r^2$ ”.

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

La representación gráfica de nuestros resultados será expuesta de la siguiente forma. Los datos obtenidos se representan en un diagrama de barras verticales y/o tabla expresando la media  $\pm$  EEM de 8 sujetos por grupo y divididos en los siguientes subgrupos:

### **Sedentarios:**

- Sed-1: Grupo de sujetos sedentarios de edad joven (18-25).
- Sed-2: Grupo de sujetos sedentarios de mediana edad (38-55).
- Sed-3: Grupo de sujetos sedentarios de edad avanzada (>55).

### **Recreacionales:**

- Rec-1: Grupo de sujetos de práctica deportiva recreacional de edad joven (18-25).
- Rec-2: Grupo de sujetos de práctica deportiva recreacional de mediana edad (38-55).
- Rec-3: Grupo de sujetos de práctica deportiva recreacional de avanzada edad (>55).

### **Élite:**

- Eli-1: Grupo de sujetos de práctica deportiva de élite de edad joven (18-25).

- Eli-2: Grupo de sujetos de práctica deportiva de élite de mediana edad (38-55).
- Eli-3: Grupo de sujetos de práctica deportiva de élite de avanzada edad (>55).

La Ilustración 30 muestra un ejemplo gráfico de la representación de la significación estadística ( $p < 0,05$ ).

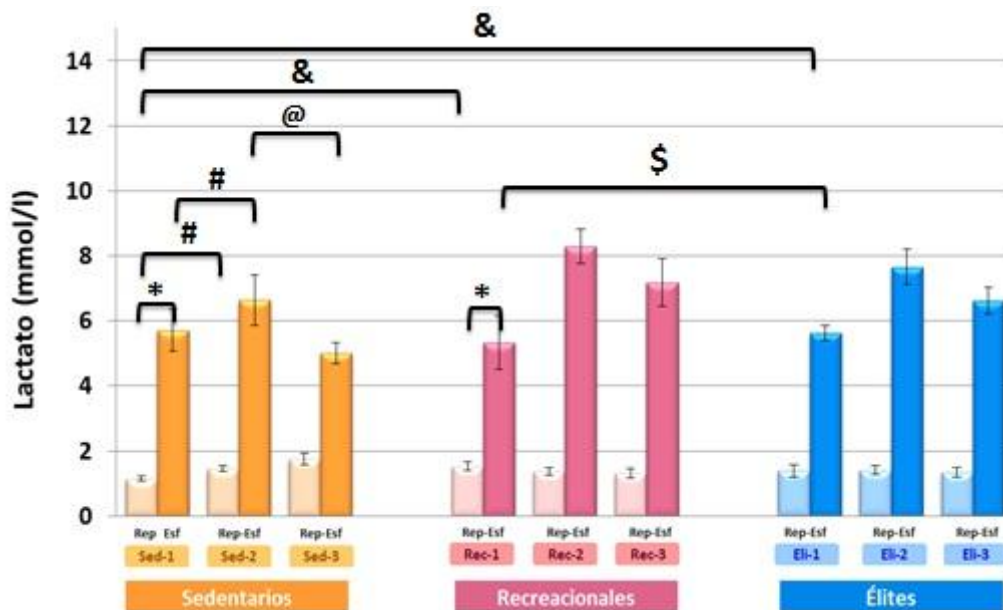


Ilustración 30. Ejemplo significación estadística en diagrama de barras.

Hemos utilizado dicha simbología para expresar significación estadística ( $p < 0,005$ ) en los siguientes casos:

\* Cuando comparamos las situaciones de reposo frente a esfuerzo dentro de cada grupo de edad y/o volumen de actividad física.

# Cuando comparamos las situaciones de reposo o esfuerzo, de los grupos de edad 2 o 3 frente al 1.

@ Cuando comparamos las situaciones de reposo o esfuerzo, de los grupos de edad 3 frente al 2.

& Cuando comparamos las situaciones de reposo y esfuerzo de cada grupo de edad de recreacionales y/o élites frente a sedentarios.

## CAPÍTULO III: Material y Método

§ Cuando comparamos las situaciones de reposo y esfuerzo de cada grupo de edad de recreacionales frente a élite.

β Cuando comparamos un subgrupo que presenta diferenciación estadística con respecto a todos los subgrupos.



## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS**



## 4.1. Parámetros de selección de sujetos y de evaluación corporal

### 4.1.1. Criterios de selección de los sujetos experimentales

La tabla 12 muestra las principales características de los subgrupos de sujetos experimentales participantes en nuestra investigación. Hemos tomado como principal referencia para su selección, los parámetros de edad y horas de entrenamiento y/o de práctica deportiva, con predominio aeróbico, realizadas a la semana, además de otros criterios relacionados con su salud y nutrición, descritos en el apartado de material y métodos. Como se puede observar, para ambas variables, nuestros sujetos se encuentran dentro del rango adecuado para poder alcanzar los objetivos propuestos y con las diferencias estadísticas que eran de esperar entre los diferentes subgrupos de edad y práctica deportiva. Es destacable la correspondencia existente entre aumento de peso y edad en todos los subgrupos y como se produce un comportamiento inverso en el caso de la relación peso y horas de práctica deportiva, en la mayoría de los casos.

### 4.1.2. Características antropométricas

Tabla 15. Características antropométricas de los sujetos participantes en el estudio.

Grupos	(n=72)	IMC	Grasa Corporal (%)	Masa Muscular (%)	Endomorfia	Mesomorfia	Ectomorfia
S1	8	23,51 ± 0,57	18,03 ± 0,84	46,95 ± 0,81	3,40 ± 0,37	6,62 ± 0,46	2,50 ± 0,30
S2	8	28,68 ± 1,29 #	19,99 ± 0,80	47,67 ± 0,73	4,49 ± 0,37	7,03 ± 0,49	0,08 ± 0,48 #
S3	8	27,38 ± 0,89	22,84 ± 0,87 #	43,62 ± 1,19 @	5,28 ± 0,29 #	5,43 ± 0,57	0,56 ± 0,25 #
R1	8	22,64 ± 0,71	18,05 ± 0,79	46,57 ± 0,80	3,20 ± 0,37	5,64 ± 0,68	2,80 ± 0,33
R2	8	26,74 ± 0,77 #	18,78 ± 0,72	47,16 ± 0,65	3,53 ± 0,48	7,33 ± 0,28	1,23 ± 0,47
R3	8	26,40 ± 0,65 #	20,04 ± 0,57	45,46 ± 0,59	4,26 ± 0,24	7,43 ± 0,50	0,74 ± 0,30 #
E1	8	23,00 ± 1,05	16,47 ± 0,93	47,32 ± 1,14	3,11 ± 0,54	6,88 ± 0,63	3,59 ± 1,20
E2	8	23,68 ± 0,75	18,08 ± 0,88	47,03 ± 0,81	2,95 ± 0,34	6,43 ± 0,76	2,22 ± 0,38
E3	8	27,23 ± 0,42 #	19,36 ± 0,57	46,58 ± 0,68	4,48 ± 0,27	12,66 ± 1,04	0,83 ± 0,20

En la tabla 15 se muestran los datos correspondientes a los promedios de variables antropométricas necesarias para demostrar la homogeneidad de los subgrupos experimentales. Refiriéndonos a los valores de IMC, parámetro recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los resultados muestran, que en nuestro estudio, la mayoría de subgrupos obtienen un promedio de 25, considerado un valor normal por la OMS. Además, podríamos destacar que existe una relación directa entre aumento de edad y del IMC. Por otro lado, algunos subgrupos se sitúan próximos a la clasificación de Obeso (30) como son los casos de los subgrupos Sed-2 ( $28,68 \pm 1,29$ ) y Sed-3 ( $27,38 \pm 0,89$ ), existiendo significaciones estadísticas.

Si hacemos referencia a los valores obtenidos de masa grasa expresados en %, se corroborarían los resultados comentados anteriormente con respecto al valor de IMC, donde igualmente son los subgrupos sedentarios, los que presentan promedios más elevados, con valores por encima del 22%.

En el caso de la masa muscular (%), los valores promedios obtenidos son considerados normales. Además, podemos percibir como existe una relación inversamente proporcional con respecto a la masa grasa, produciéndose una disminución general de la masa muscular en función de la edad, afectando notablemente al subgrupo Sed-3 ( $43,62 \pm 1,19$  %). Los promedios más elevados, son alcanzados por los subgrupos elite con valores próximos a  $47 \pm 1\%$ .

El estudio del somatotipo nos permite apreciar diferencias significativas relacionadas principalmente con las 2 variables más relevantes en nuestro estudio, edad y volumen de práctica deportiva semanal.

A continuación se representan en diferentes somatocartas los valores individuales de los grupos, sedentarios, recreacionales y élites. En todas ellas se puede apreciar que el componente endomórfico sufre un aumento en relación al aumento de edad y se acentúa en los grupos no asiduos a práctica deportiva.



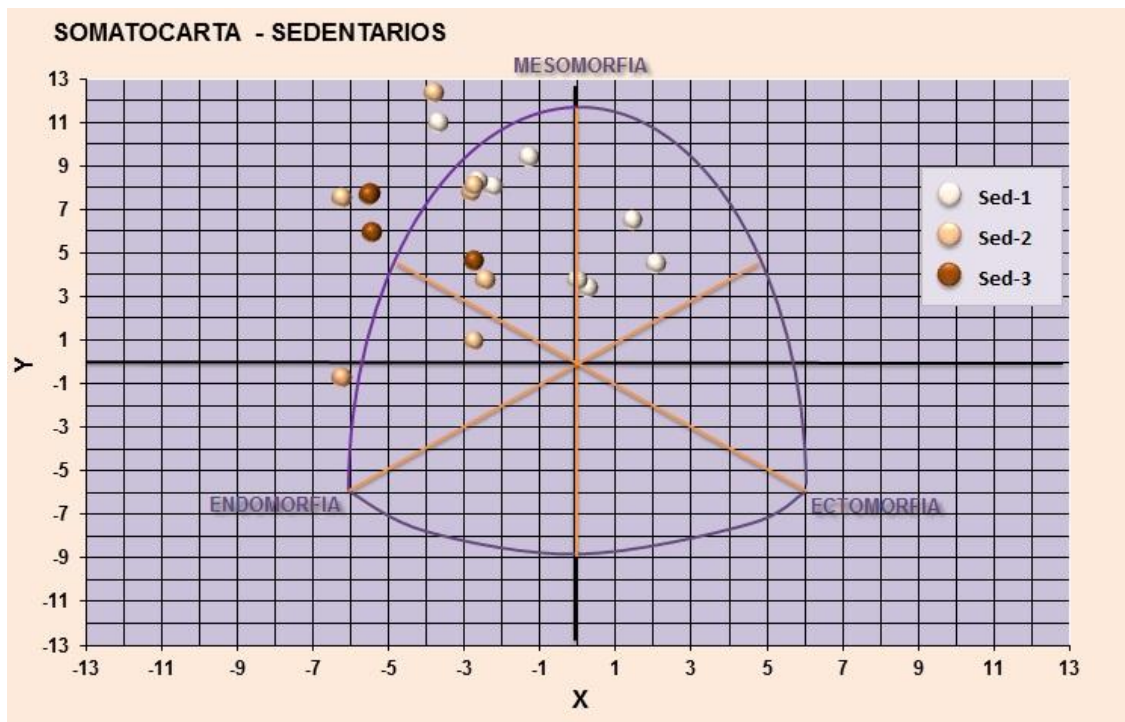


Ilustración 31. Somatocarta de los somatotipos individuales del grupo de sujetos Sedentarios.

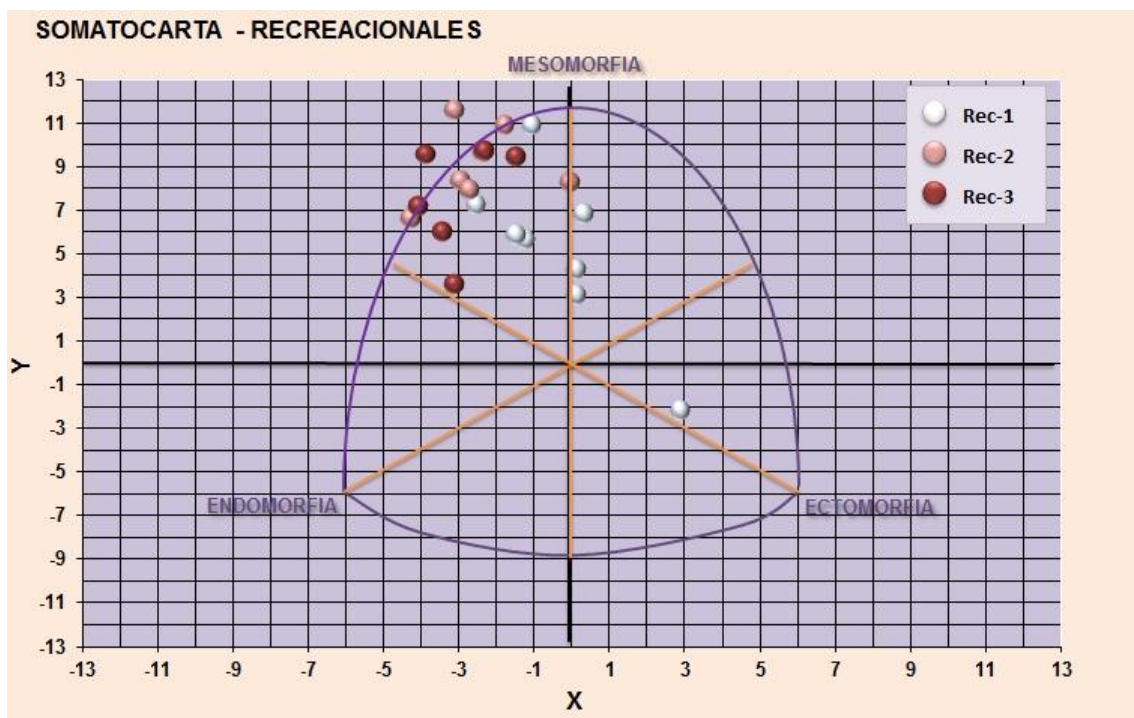


Ilustración 32. Somatocarta de los somatotipos individuales del grupo de sujetos Recreacionales.

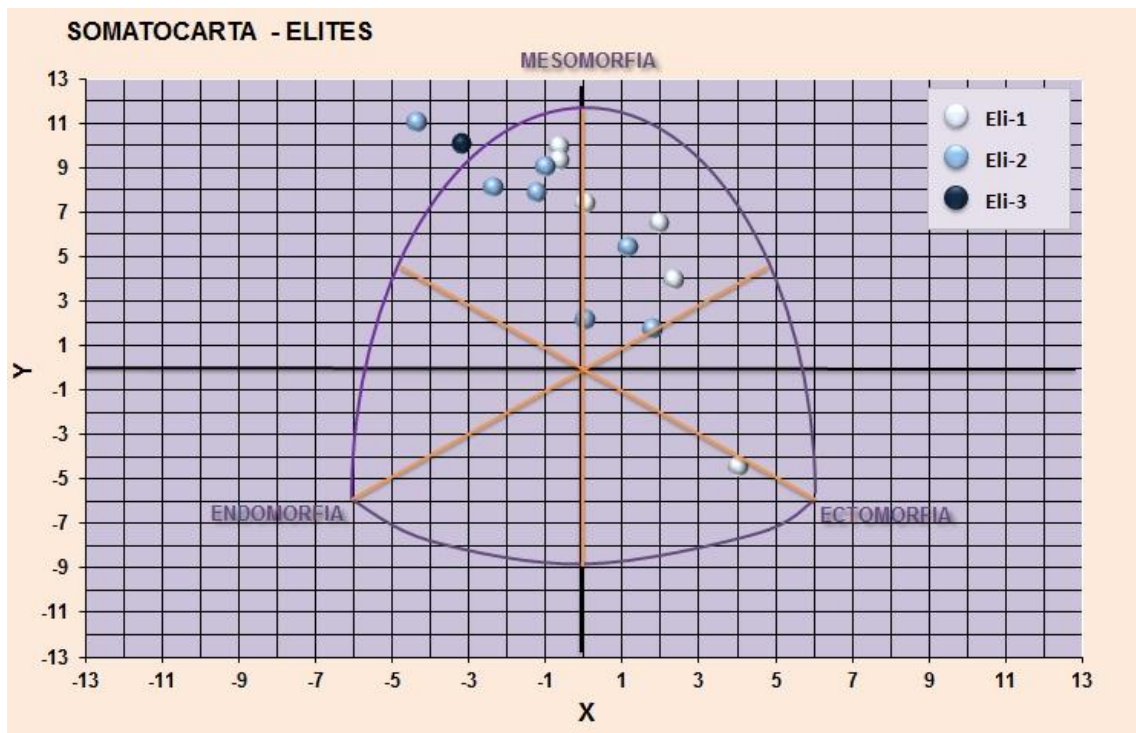


Ilustración 33. Somatocarta de los somatotipos individuales del grupo de sujetos Élite.

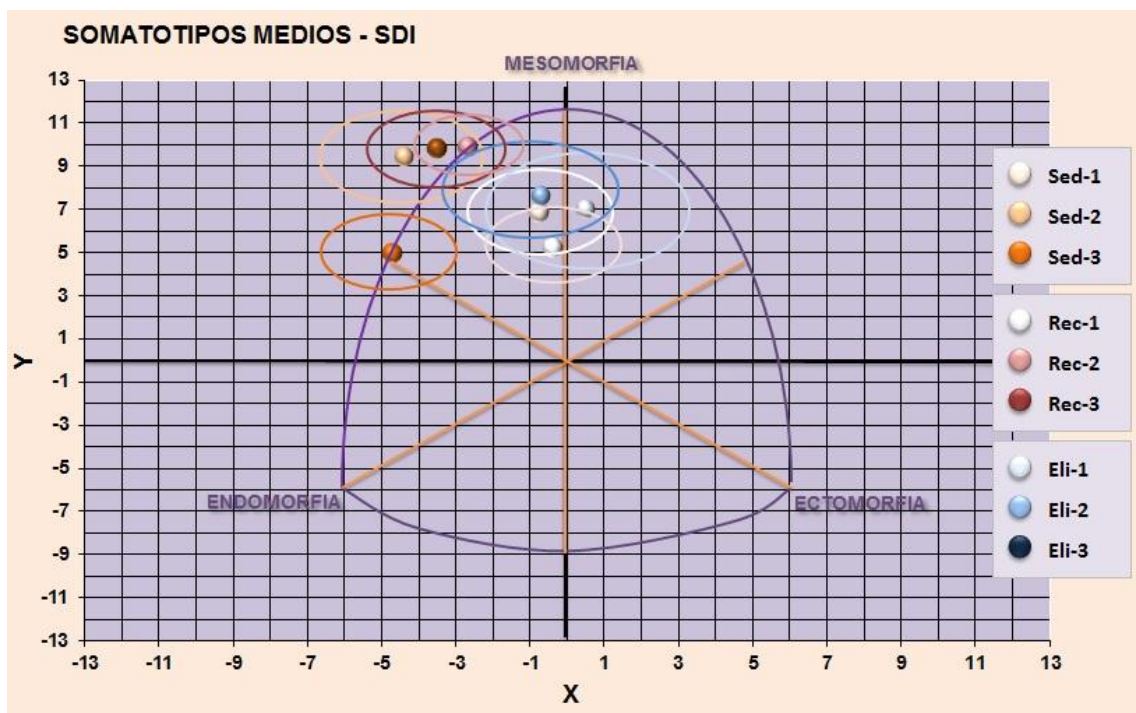


Ilustración 34. Somatocarta con los somatotipos medios de todos los grupos del estudio, incluido la SDD de cada uno de ellos.

En la ilustración 34 podemos apreciar las diferencias entre los somatotipos medios de todos los grupos del estudio. Los subgrupos de mayor edad y correspondientes a sedentarios Sed-2 ( $4,49 \pm 0,37$ ) y Sed-3 ( $5,28 \pm 0,29$ ), son aquellos que adquieren resultados más elevados del componente endomórfico tal y como comentamos anteriormente y existiendo diferencias significativas en el caso del subgrupo Sed-3. Los resultados que figuran próximos a Mesomorfo-balanceado en la somatocarta son los obtenidos por los subgrupos, Eli-1 ( $3,11 \pm 0,54$ ;  $6,88 \pm 0,63$ ;  $3,59 \pm 1,20$ ) y Eli- 2 ( $2,95 \pm 0,34$ ;  $6,43 \pm 0,76$ ;  $2,22 \pm 0,38$ ). Es importante resaltar que el subgrupo Eli-3 ( $4,48 \pm 0,27$ ;  $12,66 \pm 1,04$ ;  $0,83 \pm 0,20$ ) alcanza los valores promedios más elevados en el componente mesomórfico y con diferencias estadísticamente significativas con respecto a todos los participantes y no siendo posible su representación gráfica en la somatocarta.

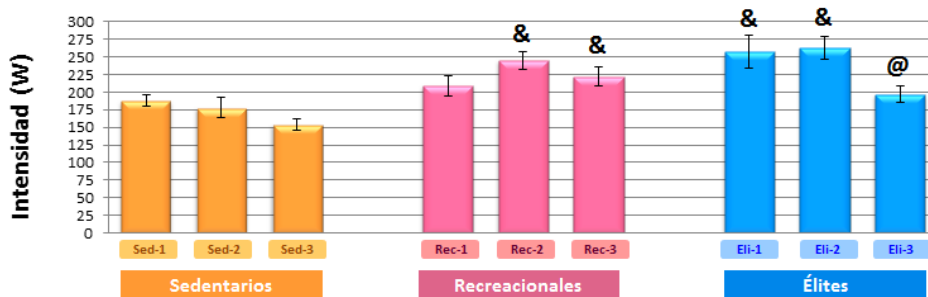
### 4.1.3. Parámetros bioquímicos relacionados con la actividad física y la salud

Tabla 16. Valores promedios de los parámetros analizados en la bioquímica general de los subgrupos evaluados en el estudio.

Grupos	(n=72)	UREA (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)	GGT (U/l)	AC. UR (mg/dl)	COL. (mg/dl)	PROT. TOT. (mg/dl)	GLUCOSA (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	CREAT. (mg/dl)	SODIO (nmol/l)	K+ (nmol/l)	CLORO (nmol/l)
Sed-1 rep	8	33,25 ± 1,47	16,25 ± 1,70	6,38 ± 1,15	14,13 ± 2,22	4,70 ± 0,31	152,63 ± 8,71	6,53 ± 0,14	69,88 ± 2,20	43,50 ± 2,11	73,63 ± 11,14	0,92 ± 0,03	133,38 ± 1,08	22,83 ± 0,91	96,29 ± 1,01
Sed-1 esf	8	31,14 ± 1,84	18,83 ± 2,20	11,43 ± 3,84	11,25 ± 1,75	4,49 ± 0,14	150,00 ± 11,16	6,68 ± 0,29	76,43 ± 2,15	41,86 ± 3,62	85,17 ± 8,71	0,93 ± 0,05	134,50 ± 3,67	23,72 ± 0,91	96,43 ± 2,34
Sed-2 rep	8	35,17 ± 2,59	19,40 ± 2,50	12,67 ± 3,91	21,86 ± 7,34	5,03 ± 0,33	155,83 ± 38,07	6,60 ± 0,18	98,71 ± 7,39	35,67 ± 3,83	93,50 ± 11,20	0,97 ± 0,08	131,00 ± 1,13	#26,62 ± 2,40	96,04 ± 0,74
Sed-2 esf	8	34,86 ± 2,79	25,75 ± 3,26	17,00 ± 2,94	22,00 ± 4,07	5,55 ± 0,37	228,00 ± 20,27	6,33 ± 0,91	93,63 ± 6,73	37,75 ± 3,28	120,88 ± 16,02	0,98 ± 0,06	136,00 ± 1,56	27,88 ± 2,67	97,83 ± 1,41
Sed-3 rep	8	27,33 ± 3,28	11,67 ± 5,61	16,00 ± 4,14	5,00 ± 14,96	4,58 ± 0,49	219,33 ± 4,91	6,81 ± 0,11	100,25 ± 8,99	36,50 ± 3,23	117,33 ± 16,37	0,94 ± 0,09	133,00 ± 1,47	#31,04 ± 5,43	96,13 ± 0,76
Sed-3 esf	8	34,50 ± 7,24	19,75 ± 3,20	9,50 ± 4,50	19,50 ± 5,52	4,78 ± 0,63	216,75 ± 15,56	6,60 ± 0,43	101,50 ± 8,09	34,00 ± 3,85	121,75 ± 14,57	0,85 ± 0,08	135,20 ± 2,56	26,89 ± 3,80	97,76 ± 1,59
Rec-1 rep	8	31,38 ± 2,97	22,38 ± 2,90	11,38 ± 2,31	11,88 ± 1,08	4,50 ± 0,34	139,38 ± 12,00	5,73 ± 0,15	84,13 ± 4,71	33,38 ± 1,69	78,75 ± 11,27	0,90 ± 0,03	119,38 ± 0,89	g63,09 ± 4,63	g85,18 ± 0,91g
Rec-1 esf	8	32,50 ± 3,81	25,75 ± 3,51	11,38 ± 1,74	13,75 ± 1,58	4,54 ± 0,48	154,75 ± 17,46	6,30 ± 0,31	83,75 ± 4,08	36,50 ± 2,22	81,18 ± 18,39	0,93 ± 0,05	125,00 ± 5,46	61,37 ± 3,17	g88,23 ± 3,73
Rec-2 rep	8	33,14 ± 1,74	21,14 ± 2,43	9,71 ± 1,54	24,43 ± 4,51	4,16 ± 0,23	199,86 ± 14,25	6,59 ± 0,21	83,57 ± 6,23	33,71 ± 2,33	111,43 ± 8,79	0,76 ± 0,14	131,71 ± 1,06	23,05 ± 1,26	#95,24 ± 0,44#
Rec-2 esf	8	38,50 ± 2,60	21,75 ± 2,17	9,63 ± 1,40	24,13 ± 5,66	5,06 ± 0,40	223,38 ± 12,47	7,05 ± 0,19	91,41 ± 13,02	38,63 ± 2,11	140,13 ± 9,58	#1,06 ± 0,05	138,75 ± 2,22	28,27 ± 5,82	99,13 ± 1,52
Rec-3 rep	8	40,60 ± 2,82	18,80 ± 1,16	7,80 ± 1,24	21,86 ± 3,28	4,86 ± 0,36	208,25 ± 13,97	6,89 ± 0,23	86,86 ± 4,10	37,57 ± 6,30	125,00 ± 11,67	1,01 ± 0,06	134,71 ± 0,78	25,12 ± 1,08	#96,57 ± 0,69
Rec-3 esf	8	37,14 ± 5,27	16,57 ± 3,37	8,71 ± 1,15	20,86 ± 4,71	5,09 ± 0,17	186,86 ± 26,40	7,07 ± 0,18	100,14 ± 4,71	43,57 ± 4,33	128,33 ± 5,86	1,09 ± 0,04	135,43 ± 1,59	25,65 ± 0,87	95,69 ± 1,17
Eli-1 rep	8	38,43 ± 3,91	21,43 ± 2,53	8,86 ± 0,51	12,00 ± 2,25	4,11 ± 0,26	154,14 ± 6,39	6,29 ± 0,11	79,71 ± 5,95	39,43 ± 4,15	87,71 ± 6,10	0,77 ± 0,13	128,29 ± 1,90	32,86 ± 7,35	92,50 ± 1,60
Eli-1 esf	8	39,14 ± 3,83	25,43 ± 2,36	9,29 ± 0,52	13,00 ± 1,88	4,29 ± 0,29	172,43 ± 9,77	6,90 ± 0,14	88,57 ± 4,91	44,00 ± 4,74	99,14 ± 8,09	0,90 ± 0,05	131,29 ± 1,46	32,18 ± 6,59	92,86 ± 1,25
Eli-2 rep	8	33,00 ± 4,07	25,67 ± 5,69	15,67 ± 4,03	24,67 ± 4,90	7,42 ± 1,58	147,15 ± 29,90	6,48 ± 0,17	70,97 ± 13,81	45,33 ± 3,02	101,33 ± 8,93	0,98 ± 0,06	131,83 ± 0,70	25,70 ± 1,61	96,75 ± 0,61
Eli-2 esf	8	38,17 ± 4,61	25,83 ± 2,85	16,17 ± 2,64	25,50 ± 6,00	5,57 ± 0,41	190,67 ± 10,39	6,83 ± 0,28	92,67 ± 5,85	47,33 ± 2,86	112,00 ± 12,74	1,05 ± 0,05	131,67 ± 0,49	25,97 ± 1,92	93,52 ± 0,52
Eli-3 rep	8	39,57 ± 3,08	20,57 ± 1,21	12,71 ± 1,08	31,29 ± 9,94	5,60 ± 0,65	176,57 ± 13,92	6,43 ± 0,17	84,43 ± 3,26	41,29 ± 4,11	100,14 ± 10,04	0,94 ± 0,06	132,57 ± 1,09	26,39 ± 0,53	95,50 ± 1,31
Eli-3 esf	8	40,29 ± 3,46	23,43 ± 1,41	9,86 ± 2,60	33,00 ± 9,86	5,53 ± 0,68	189,75 ± 10,88	6,80 ± 0,19	86,00 ± 5,98	42,43 ± 3,23	106,57 ± 8,25	1,02 ± 0,07	134,00 ± 1,20	26,21 ± 0,89	95,63 ± 1,55

La tabla 16, muestra los valores promedios de los parámetros analizados en la bioquímica general a la que fueron sometidos nuestros participantes en situación de reposo y esfuerzo. Todos los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango de normalidad. Únicamente cabría destacar que las principales diferencias significativas corresponden a las concentraciones de sodio, potasio y cloro, muy en relación con las adaptaciones al entrenamiento. Es importante subrayar que los valores más altos de concentración de sodio en sangre son alcanzados principalmente por los subgrupos sedentarios post esfuerzo con valores en torno a los 136 nmol/l y el subgrupo Rec-2 con 138 nmol/l. Por otro lado habría que resaltar que las concentraciones más elevadas de Creatina y de Proteínas Totales, corresponden con los sujetos que realizan práctica deportiva frente a los sujetos sedentarios.

## 4.2. Parámetros de la prueba de esfuerzo



*Ilustración 35. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la potencia máxima alcanzada (vatios) en la prueba de esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo*

Como podemos observar en la ilustración 35, existe una disminución de la potencia submáxima alcanzada a medida que incrementa la edad de los participantes. Los valores promedio de potencia finales más elevados y por lo tanto, mayor duración del esfuerzo correspondieron a los subgrupos Eli-1 y Eli-2 con  $257 \pm 23,60$  y  $262 \pm 15,67$  vatios respectivamente. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos élités y sus correspondientes recreacionales. Por el contrario si se constataron entre el grupo sedentarios con respecto a los otros dos grupos experimentales.

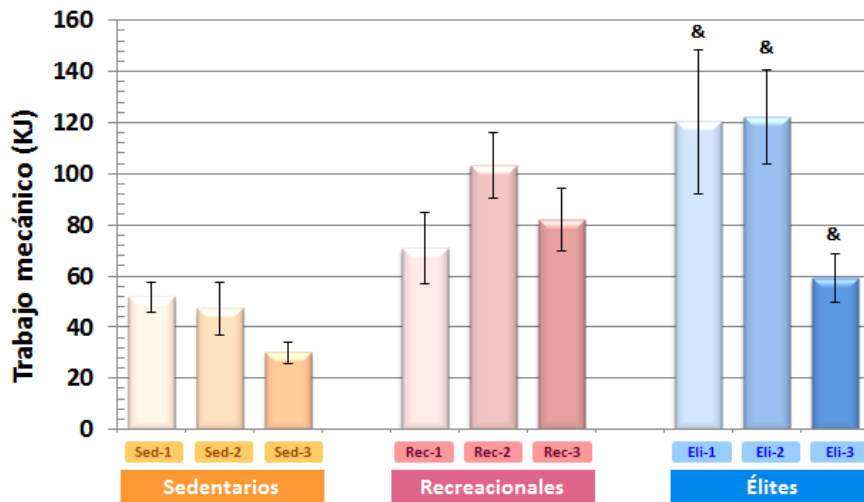


Ilustración 36. . Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de trabajo mecánico realizado en el test incremental submáximo medido en Kilojulios, por los sujetos de los distintos grupos experimentales. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

Otra medida del estudio en relación con la intensidad fue el Trabajo Mecánico. Como se puede observar (Ilustración 36), los valores más elevados fueron obtenidos por los subgrupos Eli-1 ( $135 \pm 29,62$  KJ) y Eli-2 ( $138 \pm 19,45$  KJ). Todos los subgrupos de categoría elite se diferenciaron estadísticamente frente al grupo de sedentarios. Al igual que se aprecia en otros resultados de la investigación, parece existir una relación decreciente de esta capacidad a medida que aumenta la edad de los participantes.

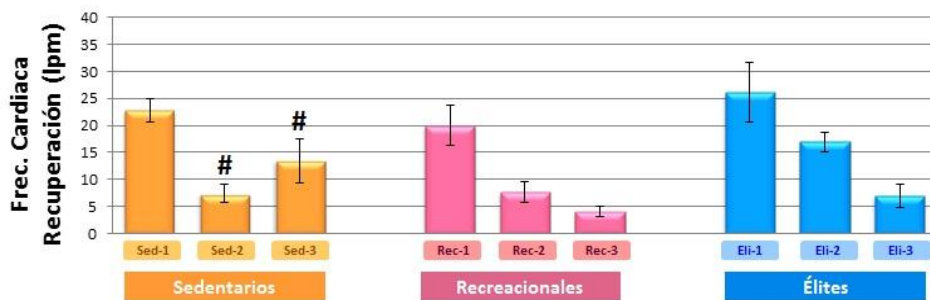


Ilustración 37. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la diferencia entre la frecuencia cardiaca post esfuerzo y al primer minuto de recuperación, alcanzada por los sujetos de los distintos grupos experimentales. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

..

Otro parámetro evaluado y ligado directamente al nivel de entrenamiento de los sujetos ha sido la Frecuencia Cardíaca de Recuperación. En el gráfico 37, se ilustran los valores medios de los latidos recuperados al minuto de concluir la prueba (Frecuencia cardíaca máxima – frecuencia cardíaca al minuto de finalizar la prueba). Como se observa, los valores promedios más elevados, es decir los que recuperan más latidos por minuto, son conseguidos en general por los subgrupos elite, destacando el subgrupo Eli-1 con  $26,14 \pm 5,6$  lpm. Existen diferencias significativas entre los subgrupos sedentarios, en concreto, los dos de edad más avanzada recuperan muy pocas pulsaciones.

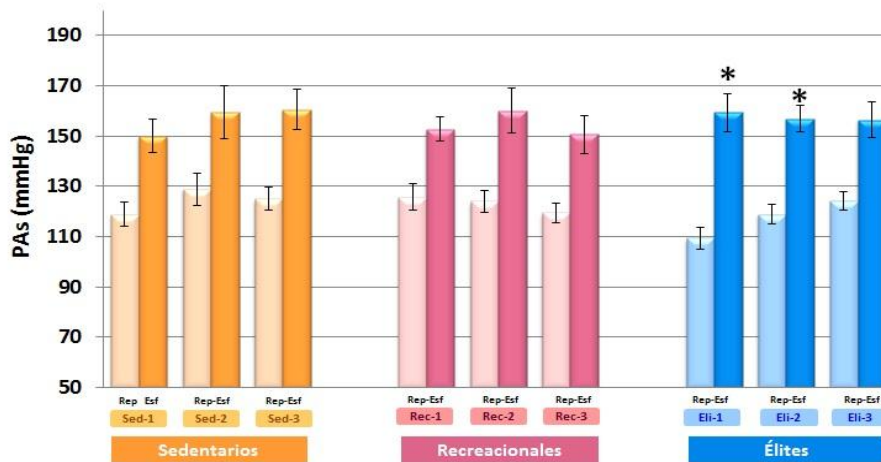


Ilustración 38. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de Presión Arterial Sistólica (mmHg) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

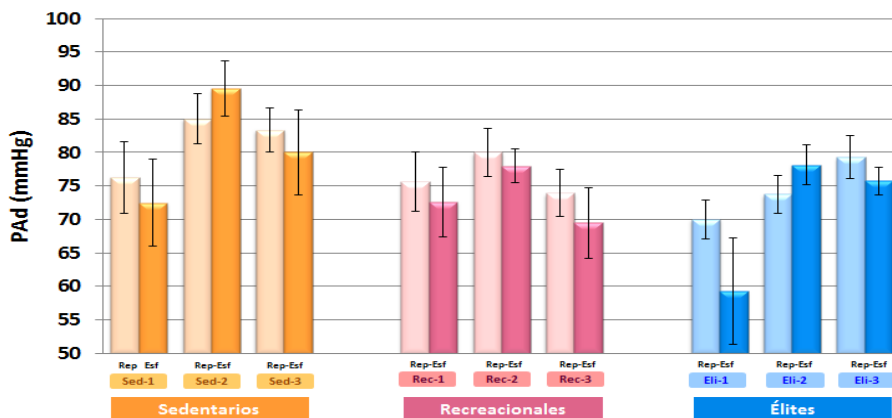


Ilustración 39. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la Presión Arterial Diastólica (mmHg) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

Todos los valores de presión arterial sistólica, como podemos observar en la ilustración 38, alcanzaron promedios en torno a 160 mmHg post-esfuerzo. Los valores inferiores de PAs en reposo y más elevados en esfuerzo, fueron alcanzados por los subgrupos Élite y el promedio más elevado en reposo y post- esfuerzo correspondió a los subgrupos Sedentarios.

Al igual que en el parámetro anterior, existen algunas diferencias aunque no significativas, entre los registros de PAd de los participantes (Ilustración 39). Los valores máximos son registrados al igual que en la PAs por los grupos de sedentarios al contrario que los subgrupos Recreacionales y Elite. Es trascendente hacer referencia a los valores más bajos obtenidos post esfuerzo destacando el grupo Eli-1,  $59,28 \pm 7,9$  mmHg. Este subgrupo experimenta un mayor descenso de la PAD síntoma de una adaptación cardiovascular al ejercicio físico y el entrenamiento y también en referencia a la edad. En general todos los subgrupos de práctica deportiva experimentan una leve caída de la PAd, pero es éste el más relevante.



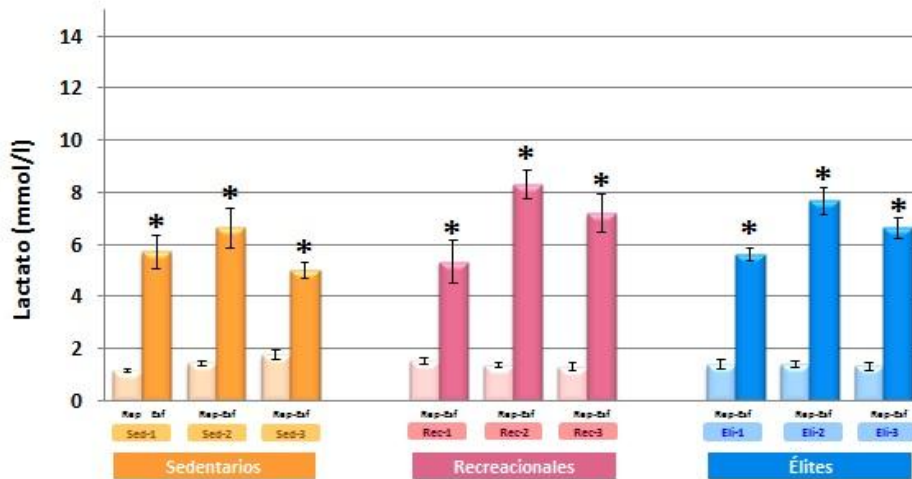


Ilustración 40. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de concentración de Lactato (mmol/l), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

Tal y como describe la literatura, las concentraciones de lactato en sangre aumentan tras un esfuerzo físico, justificando así las diferencias estadísticas encontradas. La Ilustración 40 muestra que las concentraciones de lactato post esfuerzo se encontraron en todos los subgrupos entre 5 y 8 mmol/l, superando en todos los casos el Umbral Anaeróbico (4 mmol/l).

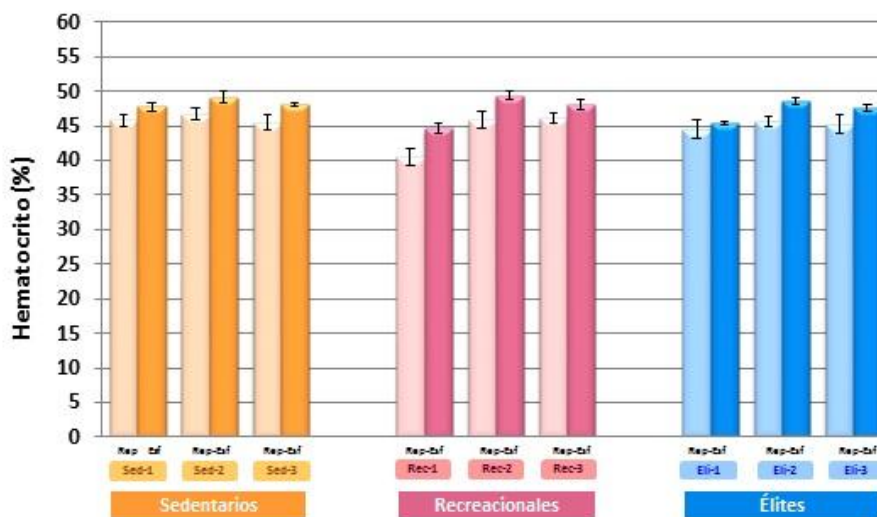


Ilustración 41. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM del Hematocrito (%) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

Otro parámetro sanguíneo de máxima utilidad y práctico en la evaluación de la condición física es el hematocrito (Ilustración 41). Es importante destacar que ningún grupo del estudio presenta adaptaciones fisiológicas de hemodilución si no que por el contrario, todos sufren hemoconcentración post-esfuerzo. Los resultados nos muestran diversas diferencias aunque no significativas entre los subgrupos recreacionales. Por otro lado, destacar que los grupos Elite experimentan menores pérdidas de volumen plasmático al cese de la prueba, probablemente fruto de una adaptación fisiológica y hematológica al entrenamiento.

### 4.3. Marcadores de daño sarcomérico. Cuantificación de la proteína $\alpha$ -actina

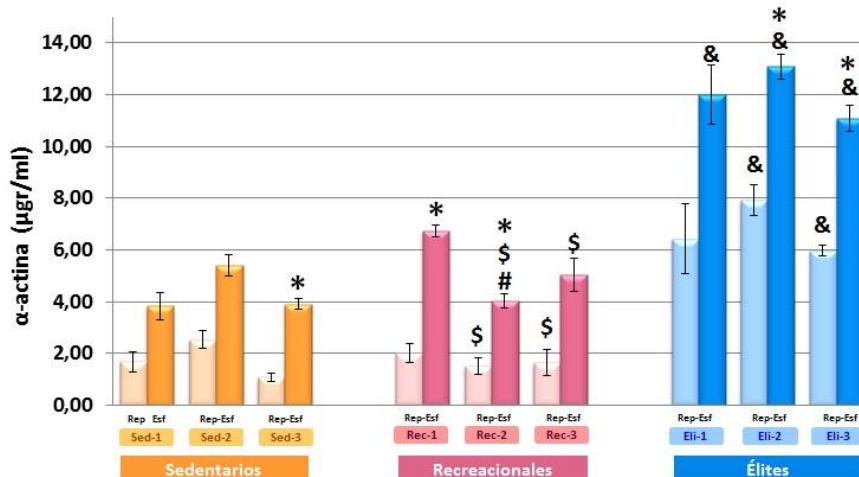
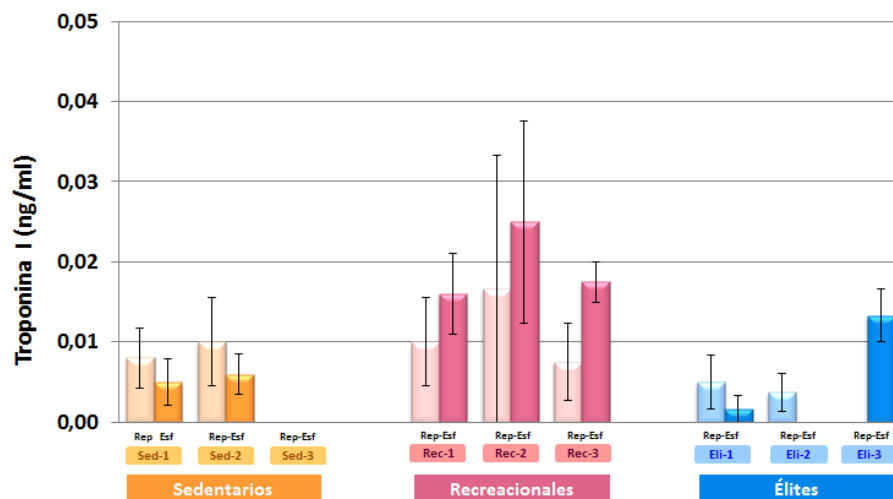


Ilustración 42. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la concentración en suero de la proteína  $\alpha$ -actina de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

En la Ilustración 42, se muestran los resultados obtenidos de concentraciones séricas de esta proteína sarcomérica. En primer lugar, podemos observar como en situación basal, son los sujetos del grupo elite los que presentan los valores más elevados mostrando diferencias significativas con respecto a sedentarios y recreacionales en las edades 2 y 3. Al minuto de cese del esfuerzo submáximo, existen algunas diferencias significativas con respecto al estado de reposo y que se acentúan a medida

que aumenta el volumen de práctica deportiva del subgrupo, en cualquier caso, siguen siendo los sujetos de mayor volumen de práctica deportiva los que manifiestan los resultados más alzados y con diferencias estadísticamente significativas en relación a la situación de reposo y frente a todos los subgrupos de sedentarios; en el caso del grupo recreacional, se mostraron diferencias estadísticamente significativas frente a los subgrupos Rec-2 y Rec-3. En lo correspondiente al aumento de edad de los subgrupos del estudio, puede apreciarse una ligera tendencia al descenso en las concentraciones de esta proteína de origen muscular, produciéndose diferencias estadísticamente significativas, únicamente en la situación de esfuerzo del subgrupo Rec-2 con respecto al Rec-1.



*Ilustración 43. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la Concentración en suero de la proteína Troponina I (cTnI) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.*

El gráfico 43 muestra las concentraciones séricas de ésta proteína de origen sarcomérico cardiaco. Aunque en nuestros datos observamos algunas diferencias entre subgrupos recreacionales con respecto a sedentarios y élite, todos los niveles de concentración fueron muy bajos (de 0.001 a 0.025 ng/ml), e inclusive algunos valores no llegaron al límite de detención del instrumento por lo que no se le pudo realizar el tratamiento estadístico.

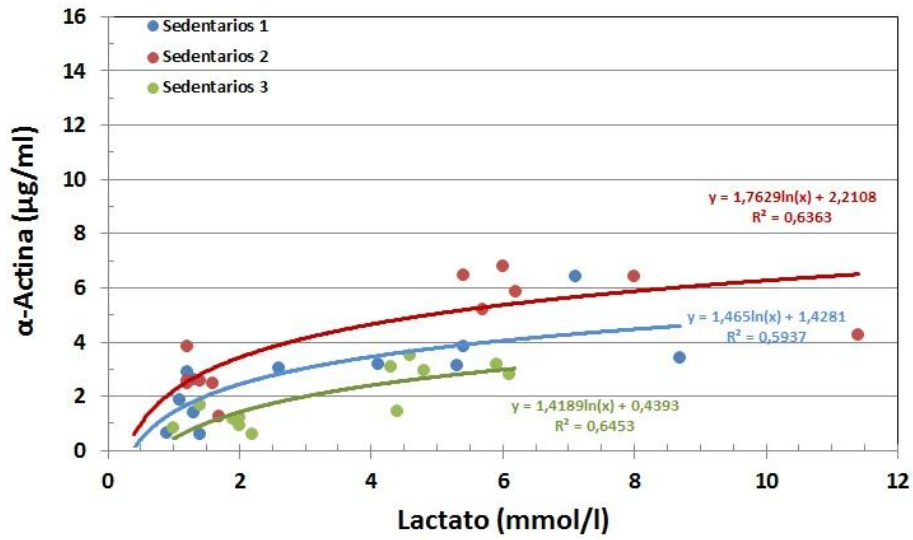


Ilustración 44. Regresiones entre  $\alpha$ -Actina ( $\mu\text{g/ml}$ ) y lactato ( $\text{mmol/l}$ ) de los tres subgrupos de edad de los sujetos sedentarios; Sed-1 ( $n=8$ ), Sed-2( $n=8$ ) Sed-3( $n=6$ ).

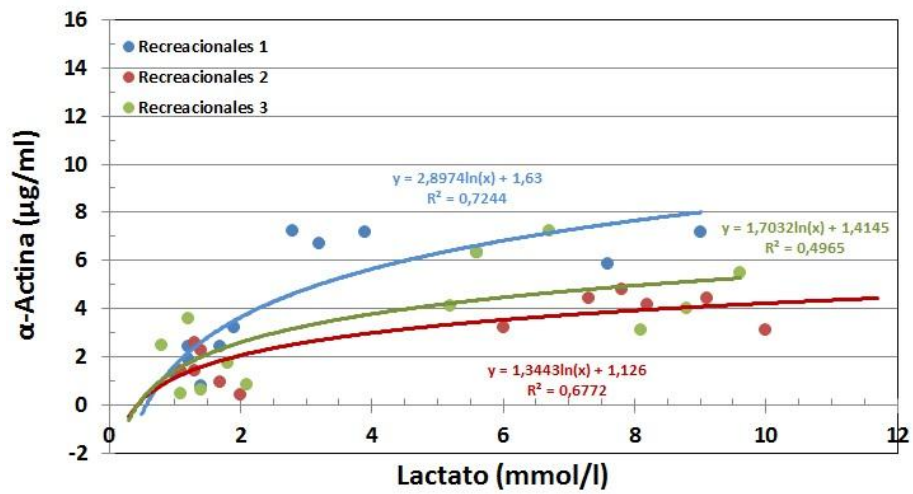


Ilustración 45. Regresiones entre  $\alpha$ -actina ( $\mu\text{g/ml}$ ) y lactato ( $\text{mmol/l}$ ) de los tres subgrupos de edad de los sujetos recreacionales; Rec-1( $n=8$ ), Rec-2( $n=10$ ), Rec-3( $n=8$ ).

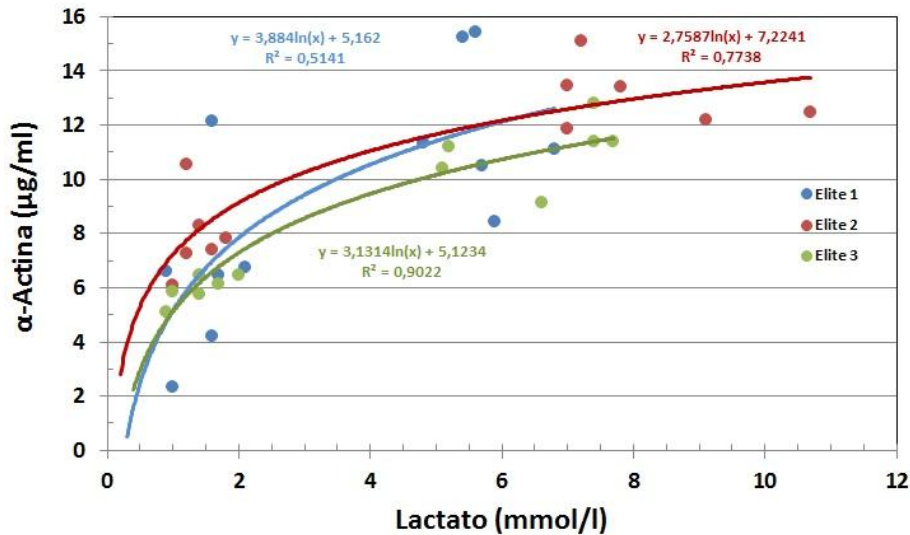


Ilustración 46. Regresiones entre  $\alpha$ -actina ( $\mu\text{g/ml}$ ) y lactato ( $\text{mmol/l}$ ) de los tres subgrupos de edad de los sujetos élites; Eli-1 ( $n=7$ ); Eli-2 ( $n=8$ ); Eli-3 ( $n=7$ ).

Las ilustraciones 44, 45 y 46, muestran la relación existente entre las concentraciones de lactato y de  $\alpha$ -actina en los diferentes grupos experimentales. En todos los subgrupos existe una regresión significativa ( $p < 0.05$ ), que se ajusta a una curva logarítmica, pero sin diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los correspondientes subgrupos de edad. Los grupos sedentario y recreacional, muestran una dinámica muy similar con valores relativamente bajos de actina para una concentración dada de lactato. Lo más relevante de nuestros resultados reside en la dinámica mostrada por los sujetos de categoría élite, los cuales a diferencia de lo observado en sedentarios y recreacionales, presentan un mayor incremento de la proteína sarcomérica para una misma concentración de lactato.

## 4.4. Marcadores de envejecimiento por estrés oxidativo

### 4.4.1. Daño en el ADN de linfocitos periféricos

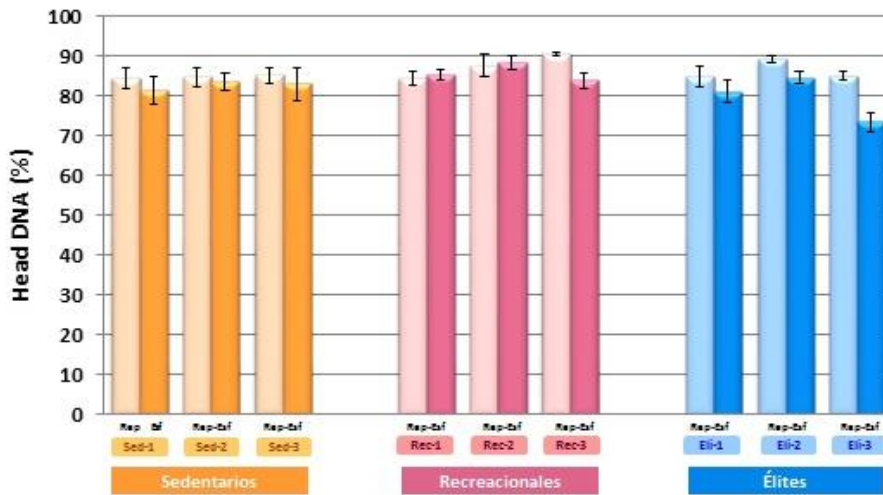


Ilustración 47. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de DNA HEAD O ADN EN CABEZA (%) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo

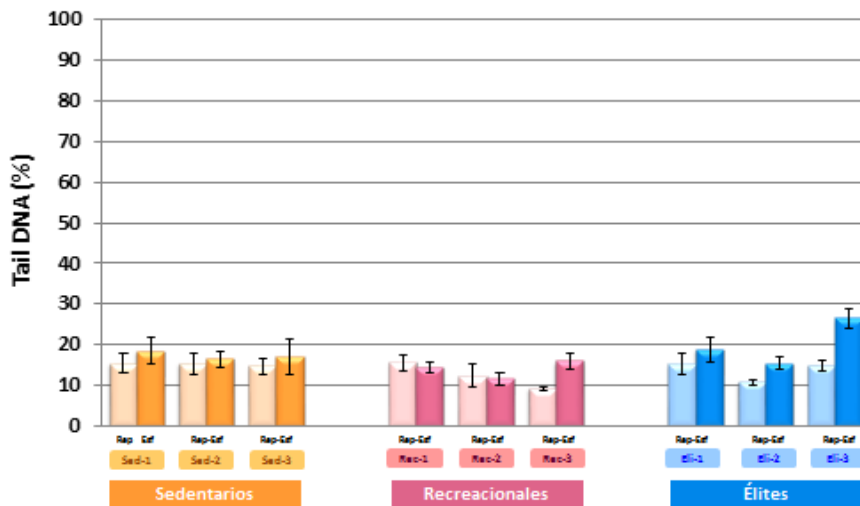


Ilustración 48. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM DNA TAIL O DNA EN COLA (%) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

Los gráficos 47 y 48 revelan que los valores promedio destacados en relación a la pérdida de ADN en la cabeza post- esfuerzo, corresponden a los grupos Élite. Estos resultados se relacionan directamente con los valores más elevados obtenidos post-test de % ADN ganado en la cola, e incluso, dan a lugar a diferencias aunque no significativas, trascendentes entre estos sujetos y los pertenecientes al resto de grupos, sugiriendo, que son los grupos de mayor volumen de practica deportiva, los que sufren mayores daños por estrés en el ADN de estas células.

Es de resaltar, que los sujetos que presentan menor daño tanto en reposo como en esfuerzo, son los pertenecientes al grupo Recreacional. Igualmente, podemos percibir que parecen producirse mayores cantidades de ADN fragmentado en cola en relación al avance de edad.

#### 4.4.2. Marcadores plasmáticos de peroxidación lipídica

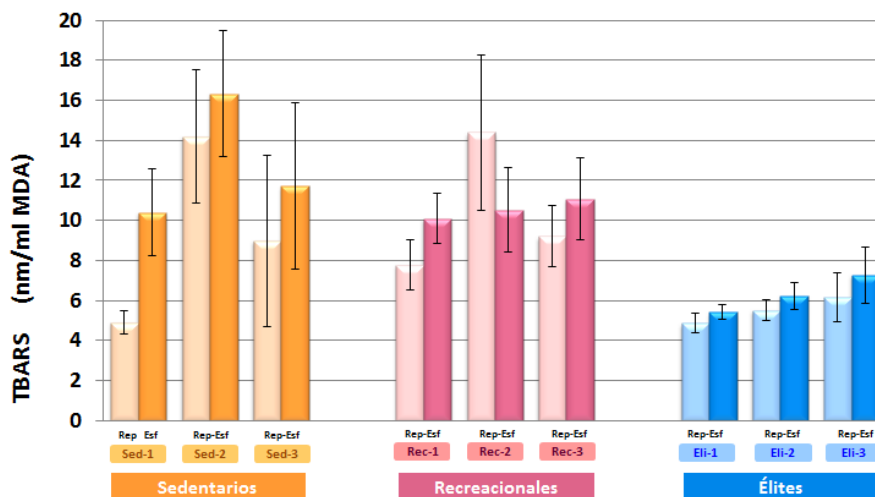
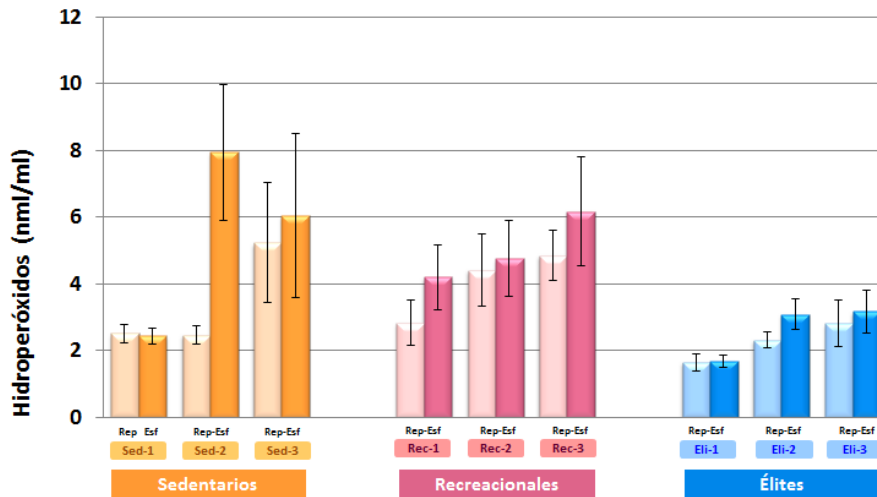


Ilustración 49. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la concentración plasmática de TBAR's (nmol/ml MDA) de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo



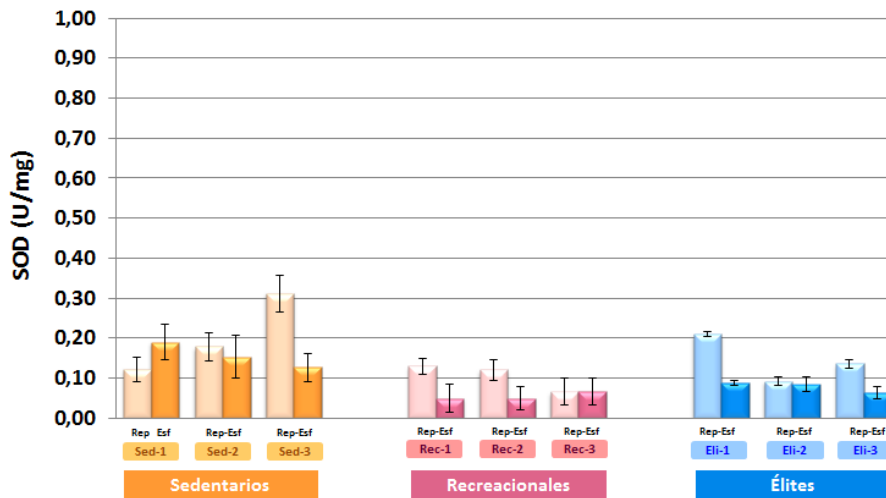
*Ilustración 50. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la concentración plasmática de Hidroperóxidos, de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.*

Tanto las concentraciones de TBARs como de Hpx en plasma (Ilustraciones 49 y 50) experimentan un ascenso en relación directa con la edad. Es de destacar, que también en ambos casos, los valores promedios inferiores son claramente alcanzados en los sujetos de modalidad Élite con respecto al resto de grupos; aunque no existan diferencias significativas, los resultados nos muestran una clara tendencia de estos subgrupos a una menor producción de estas sustancias.

#### 4.4.3. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes citosólicas

Otro parámetro evaluado es la actividad de las enzimas antioxidantes citosólicas como: Superóxido Dismutasa, Catalasa, Glutación peroxidasa y Glutation Reductasa.



4.4.3.1. *Superóxido Dismutasa (SOD)*

*Ilustración 51. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (U/mg), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.*

Con respecto a los resultados obtenidos del antioxidante enzimático SOD (U/mg) (Ilustración 51), podemos observar que su actividad es más elevada en situación basal en la mayoría de los casos, el valor más alto fue alcanzado por el grupo Sed-3 ( $0,23 \pm 0,12$  U/mg) en situación de reposo, siendo relevante frente al resto de resultados. En general, los valores más elevados de actividad de esta enzima corresponden a los subgrupos sedentarios principalmente. No existe un comportamiento regular relacionado con el aumento de edad, ya que en algunos grupos aumenta y en otros disminuye, por lo que podíamos intentar relacionar con diferentes adaptaciones según el volumen de práctica deportiva realizada y que trataremos de justificar en el apartado de discusión.

#### 4.4.3.2. Catalasa (CAT)

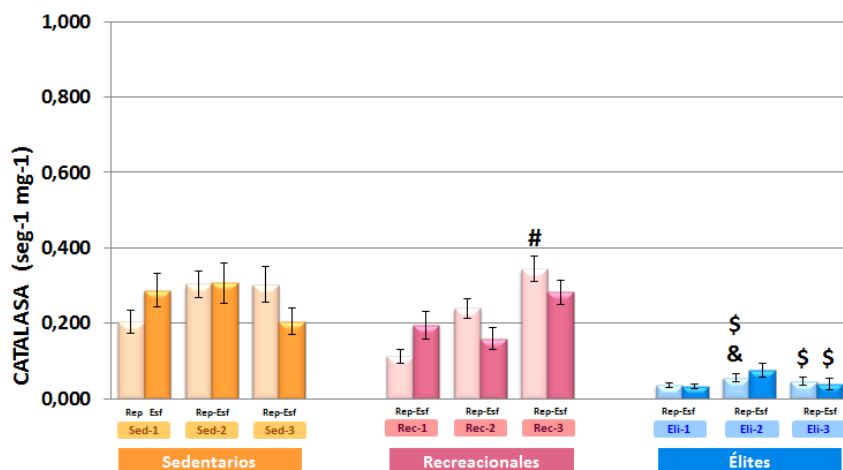


Ilustración 52. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la actividad enzimática de la Catalasa ( $\text{seg-1mg-1}$ ), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

La ilustración 52 muestra que los subgrupos élite presentan los valores más bajos de actividad enzimática en Catalasa ( $\text{seg-1mg-1}$ ) y con diferencias estadísticamente significativos en la mayoría de los casos.

#### 4.4.3.3. Glutation Peroxidasa (GPx)

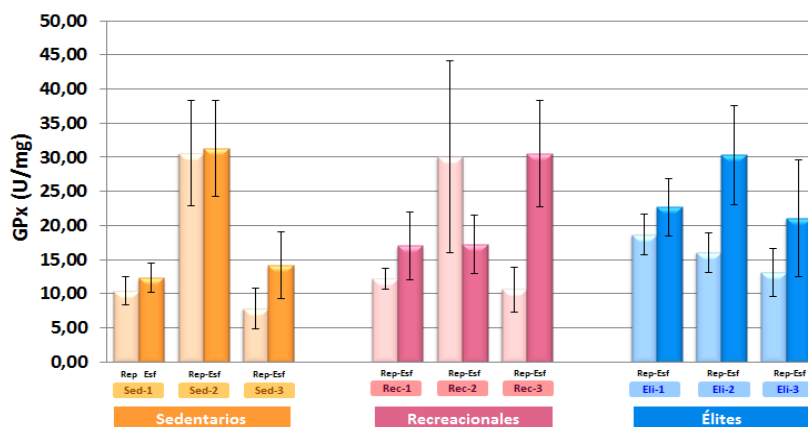


Ilustración 53. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la actividad enzimática de la Glutation Peroxidasa (U/mg), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

La actividad enzimática de éste antioxidante (Ilustración 53) se ve aumentada en la mayoría de los casos post esfuerzo, presentando diferencias importantes aunque no significativas en la mayoría de los casos. Su comportamiento con respecto a la edad no es proporcional a la misma, es decir, su actividad desciende con la edad; aunque todos los grupos experimentan un pequeño aumento tanto en reposo como en esfuerzo en la mediana edad.

4.4.3.4. *Glutation Reductasa (GR)*

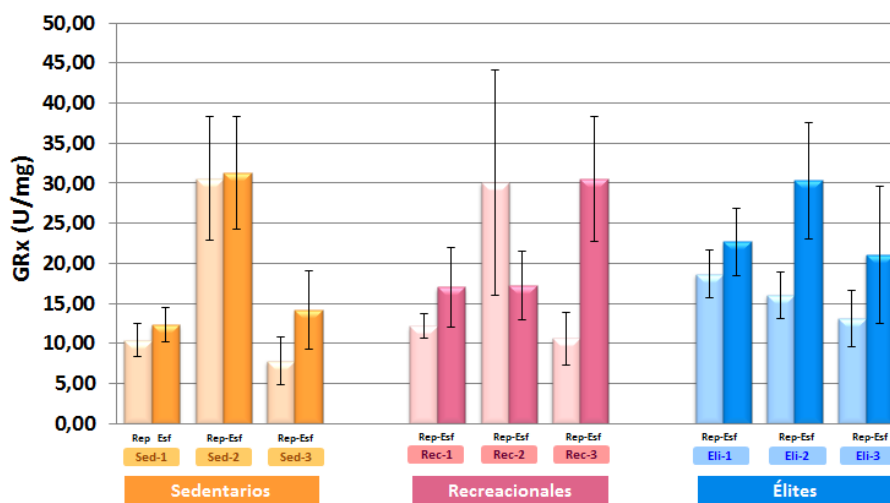


Ilustración 54. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de la actividad enzimática de la Glutation Reductasa (U/mg), de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

Como ya comentamos en el apartado de antecedentes bibliográficos, la enzima glutacion reductasa posee un papel fundamental en el ciclo del glutacion lo que la relaciona directamente con la actividad de la enzima GPx. La ilustración 54, nos muestra los datos obtenidos de la actividad enzimática de la GR en los subgrupos experimentales, los cuales, se asemejan de forma importante a los valores obtenidos en la actividad de la GPx. Lo que nos conduce a sugerir que pudiese existir una buena sincronización de ambas enzimas para su actuación contra los hidroperóxidos.

#### 4.4.4. Cuantificación de antioxidantes en plasma

##### 4.4.4.1. Retinol.

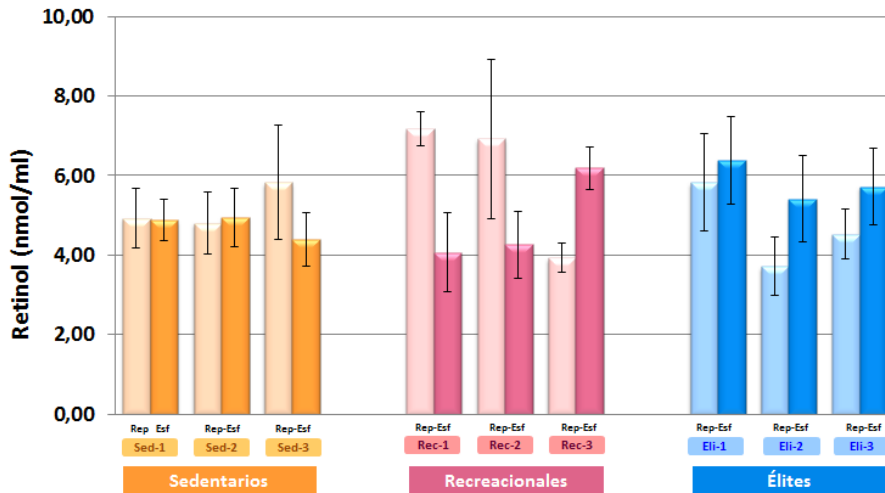


Ilustración 55. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de las concentraciones del antioxidante Retinol (nmol/ml) en plasma, de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

Los datos de la ilustración 55 presentan concentraciones de este antioxidante en plasma sin que existan diferencias significativas. Lo más relevante es el comportamiento en los subgrupos élite, donde siempre existen mayores concentraciones post esfuerzo a diferencia del resto de grupos.

## 4.4.4.2. Alfa tocoferol

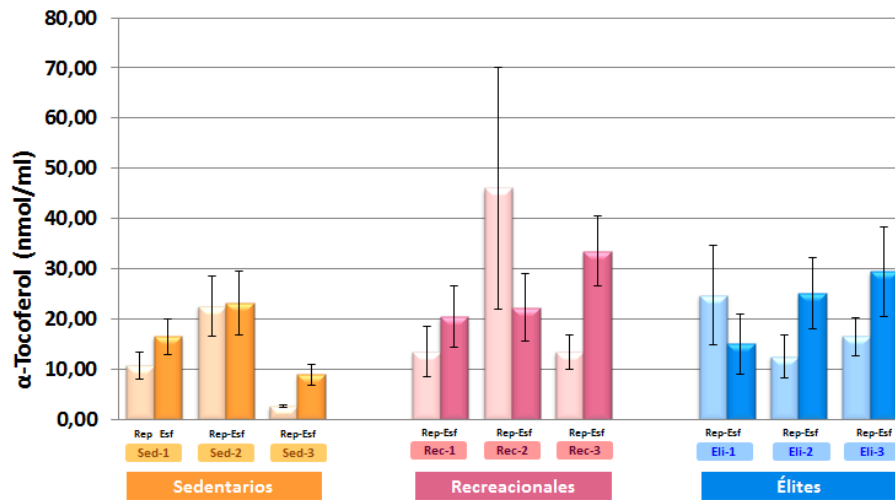


Ilustración 56. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de las concentraciones de antioxidante  $\alpha$ -tocoferol (nmol/ml) en plasma, de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

Las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol siguen un patrón (Ilustración 56) muy similar al retinol solo que alcanzan valores más elevados. Los resultados más bajos corresponden a los subgrupos sedentarios a diferencia de los de práctica deportiva, recreacional y élite. No existe una relación uniforme conforme a la edad si comparamos los diferentes grupos.

4.4.4.3. Coenzima Q10

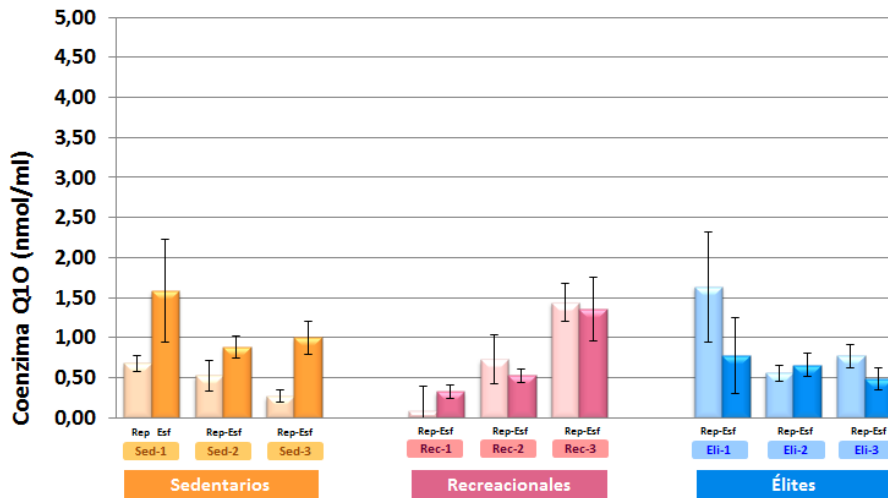


Ilustración 57. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de las concentraciones del antioxidante Retinol (nmol/ml) en plasma, de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo.

El gráfico 57 ilustra valores de este antioxidante en plasma sin que se observen diferencias relevantes ni significativas en situaciones de reposo y esfuerzo y entre diferentes grupos. Podríamos destacar el hecho de que parece ser que en los grupos con mayor volumen de práctica deportiva semanal tiene un comportamiento inversamente proporcional a la edad.

**CAPITULO V: DICUSIÓN**





## 5.1. Beneficios de la práctica deportiva para la salud y en el proceso de envejecimiento

Numerosos estudios han demostrado que la práctica de actividad física realizada de forma regular condiciona el estado de salud y previene de enfermedades asociadas al envejecimiento (Powell, et al., 1987; S. Heyden & G. Fodor, 1988; ACSM, 1993, Finkel & Holbrook, 2000) y que encabezan la lista actual de principales riesgos de mortalidad, como son las de origen cardiovascular (Ross, 1993). Tanto es así, que ha sido demostrado que riesgo muerte prematura por cualquier causa, en personas jóvenes y de mediana edad es reducido por la práctica regular de ejercicio (Nocon et al., 2008), y que además, la esperanza de vida aumenta en las personas de edad avanzada, si éstas siguen un programa de ejercicio regular (Hakim et al., 1998).

Por otro lado, es importante conocer el tipo de actividad física que se practica, ya que la intensidad de la misma está relacionada con el proceso de envejecimiento. El ejercicio físico extenuante se vincula con elevadas tasas de EROs, y altas concentraciones de estas moléculas en el organismo y que no controladas, que podrían asociarse a largo plazo con enfermedades actuales causantes de mortalidad (Huertas, et al., 1994). De hecho existen estudios que relacionan el estado de estrés oxidativo con el desarrollo de diversas enfermedades crónicas incluyendo la arterosclerosis. La oxidación de las partículas de LDL colesterol parece ser el origen del proceso de arterosclerosis (Sabán Ruíz, 2009), que es el mecanismo etiopatogénico de las principales enfermedades cardiovasculares, y que puede verse aumentado por la practica puntual e intensa de actividad física; por otro lado, parece ser que la práctica regular de actividad física de moderada intensidad disminuye la susceptibilidad de las LDL a la oxidación, lo que beneficiaría este factor de riesgo frente a las enfermedades de origen coronario (Lakka, Venalainen, & Rauramaa, 1994; Sabán Ruíz, 2009).

Que nuestro organismo no se vea desbordado ante la situación de estrés oxidativo va a depender principalmente de 3 factores:

- La tasa de producción de Radicales Libres.
- La eficiencia del sistema antioxidante en conjunto: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, en medios lipídicos y acuosos.
- El perfil lipídico y hormonal del sujeto.

Por ello nuestra investigación pretende determinar qué volumen semanal de práctica deportiva predominantemente aeróbica genera óptimas adaptaciones en nuestro organismo para no poner en compromiso los mecanismos determinantes para crear una situación de estrés oxidativo celular; y conseguir a largo plazo, hacer frente con mayor eficiencia, al proceso de envejecimiento.

Numerosas investigaciones realizadas hasta el momento en ratas y humanos, se han centrado en analizar los efectos de un ejercicio físico extenuante de forma puntual, relacionando la intensidad del mismo, con carga alta y corta duración (sprints) (Fisher Wellman & Bloomer, 2009; Mastaloudis, Leonard, & Traber, 2001; Vicent, et al., 2002; Wierzba, Olek, Fedeli, & Falcioni, 2006); o una carga media- alta durante un largo periodo de duración (Mastaloudis, et al., 2001; Mastaloudis et al., 2004; McBride, Kraemer, Triplett-McBride, & Sebastianelli, 1998). Y además, en la mayoría de los casos, han sido estudiados también los marcadores de estrés oxidativo en deportistas de élite de una determinada edad (Child, Wilkinson, & Fallowfield, 2001; Marzatico, Pansarasa, Bertorelli, Somenzini, & De la Valle, 1997; Mena, et al., 1991; Okamura et al., 1997)

Quedaría por indagar otros tipos de intensidades y poblaciones y el efecto que tiene a largo plazo ese tipo de práctica deportiva sobre la adaptación frente al estado REDOX y el proceso de envejecimiento, objetivos que pretende abordar nuestra investigación.

## 5.2. Características antropométricas de los sujetos

En nuestro estudio existen diferentes subgrupos en función de la edad y el tipo de volumen de práctica deportiva o actividad física con predominio aeróbico que realizan semanalmente. Ambas características (Luengo, Egocheaga, Egocheaga, & Dell Valle, 2000), junto con el sexo y la raza, pueden afectar a la morfología de los seres humanos.

Los datos antropométricos de nuestros sujetos experimentales se exponen en la tabla 15 mostrando una alta homogeneidad para todos los subgrupos. Los individuos sedentarios que participaban en el estudio, sobre todo los subgrupos de edad media y avanzada (Sed-2 y Sed-3), presentaron los promedios más elevados de los parámetros peso ( $83,31 \pm 4,50$  Kg y  $80,33 \pm 0,89$  Kg), IMC ( $28,68 \pm 1,29$  y  $27,38 \pm 0,89$ ) y % de grasa ( $19,99 \pm 0,80$  y  $22,84 \pm 0,87$ ), lo que se relaciona directamente con el estilo de vida sedentaria (OMS, 1990) y que los hace idóneos para los criterios de inclusión de este estudio. Además, existe una relación directa entre aumento de edad y el IMC (Reas, Nygård, Svensson, Sørensen, & Sandanger, 2007), por lo que podrían ser más susceptibles de padecer enfermedades asociadas a la tercera edad y a una pérdida de la movilidad y funcionalidad del aparato locomotor, a lo largo del proceso de envejecimiento (Fragala et al., 2012). Actualmente es conocido que la realización de un programa de ejercicio de resistencia congruente con las actuales guías de la ASMC y AHA, es eficaz para mejorar la función física en general, la clasificación funcional, y la fuerza muscular en los adultos mayores con reducidas capacidades físicas, frenando los riesgos producidos por la inactividad física y el estilo de vida sedentario (Gennuso, Zalewski, Cashin, & Strath, 2012).

Por otro lado, según la OMS, los subgrupos Sed-2 y Sed-3 estarían próximos a la catalogación como obesos tipo I, con diferencia estadísticamente significativa con respecto a sed-1, y lo que podría relacionarlos con una probabilidad alta a padecer síndrome metabólico (Chung, Kang, Lee, Lee, & Lee, 2012). Estos datos podrían estar estrechamente relacionados con la ausencia de actividad física y estilo de vida desarrollado, apoyando

nuevamente, que la práctica deportiva es una herramienta esencial para disminuir los principales factores de riesgo de mortalidad y por lo tanto, un instrumento que aporta mayores beneficios “antienvjecimiento” (Finkel & Holbrook, 2000).

Los participantes de categoría élite mostraron elevados valores de peso y en algunos casos de % de grasa. Hay que destacar que todos los sujetos tenían un aumento de % de grasa y peso más acuciante a medida que incrementaba la edad. Del mismo modo, la masa muscular experimenta un declive también asociado al aumento de edad. Es conocido que desde los 20 años de edad, existe una evolución inversamente proporcional entre la masa muscular y la edad, y que es más acentuado desde los 35 años y en personas sedentarias (McArdle, Katch, & Katch, 1996). Los subgrupos élite, siendo éstos los que realizaban mayor volumen de práctica deportiva semanal y de mayor intensidad, mostraron los promedios más bajos con respecto a la masa grasa. Tal y como nos confirman diferentes investigaciones, la practica deportiva está relacionada estrechamente con una mejora del perfil lipídico, coincidiendo esto con nuestros resultados obtenidos (Marrugat, Elosua, Covas, Molina, & Rubiés-Prat, 1996).

Los valores de somatotipo obtenidos en nuestros participantes, se relacionan con la clasificación de los subgrupos según volumen de práctica deportiva descrito en nuestro estudio. Los sujetos sedentarios presentaron los valores más elevados del componente endomórfico, los participantes de categoría recreacional mostraron resultados con bastante variabilidad somatotípica y los participantes de categoría élite, alcanzaron los datos más equilibrados de endomorfia, mesomorfia y ectomorfia, presentando valores según las tablas de referencia de somatotipos olímpicos y somatotipos deportivos de Heath y Carter (1990) afines a modalidades deportivas predominantemente aeróbicas (ciclismo en ruta o pruebas combinadas en atletismo) tal y como se muestra en las somatocartas realizadas (Ilustraciones 33 y 34) y como era objeto de nuestro estudio.

### 5.3. **Parámetros bioquímicos-clínicos relacionados con la actividad física y la salud**

Fueron analizados parámetros clínicos básicos relacionados con el estado de salud que se muestran en la tabla 16 agrupados por subgrupos experimentales. Los valores bioquímicos obtenidos se encuentran dentro de los rangos de normalidad según la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) en apoyo con la American Association for Clinical Chemistry (AACC) y actualizados en el año 2012. Estos resultados reflejan que la totalidad de nuestros sujetos gozan, a priori, de un buen estado de salud y se pueden considerar como participantes sanos, dato a resaltar, ya que poseer cualquier tipo de enfermedad o un mal estado de salud, era un criterio de exclusión de este trabajo. Además de estos datos, podríamos destacar las concentraciones elevadas de sodio existentes en el caso de los sujetos de categoría sedentaria. Este aspecto lo podríamos relacionar con pequeños problemas de deshidratación vinculado a la falta de entrenamiento (Williams, 2002). Otro dato relevante es que los subgrupos de categoría élite y recreacional, presentan en general las concentraciones más elevadas de creatina y proteínas totales, sugiriendo su relación con el aumento de actividad muscular, en concordancia al volumen-intensidad de entrenamiento de éstos subgrupos y con el % de masa muscular.

Como bien es sabido, el colesterol plasmático, está muy relacionado con problemas de origen cardiovascular y mortalidad (Abadal, C., Pérez, Puig, & Balaguer Vintró, 2001) y con procesos de estrés oxidativo. Tanto el colesterol total, como el colesterol-HDL y colesterol-LDL, experimentan también, valores en afinidad al estilo de vida y el entrenamiento realizado. Algunos datos obtenidos nos cercioran de la correcta selección de participantes; por ejemplo, las concentraciones de colesterol total, son intermedias y próximas a elevadas en los grupos Sed- 2 y Sed -3. Los altos valores plasmáticos de colesterol-LDL (>190mg/dl) se relacionan con riesgos cardiacos y como es observado, los sujetos participantes en nuestro estudio, no presentan tan elevadas concentraciones, por lo que superan otro de los parámetros de exclusión del estudio. Además el colesterol-HDL presenta las concentraciones más elevadas

en los deportistas de categoría élite tanto basal, como post esfuerzo, probablemente como consecuencia de una adaptación crónica al ejercicio, lo que justificaría lo ampliamente conocido, la actividad física es una magnífica herramienta en la prevención de enfermedades asociadas al metabolismo lipídico y cardiovasculares (Bonow et al., 2008).

De cualquier modo, volvemos a insistir, en que todos los parámetros bioquímicos se encuentran dentro de los rangos normales por lo que nuestra investigación se realizó en sujetos experimentales sanos, un criterio esencial más en nuestra inclusión de participantes para el estudio.

## 5.4. Parámetros del test de esfuerzo

Los datos obtenidos en la prueba de esfuerzo engloban diversos marcadores fisiológicos desarrollados a continuación:

### 5.4.1. Parámetros ergométricos

#### - Intensidad (potencia, trabajo, tiempo):

Los principales factores que influyen en un incremento de producción de Radicales Libres durante la actividad física son la duración del ejercicio (Mastaloudis, et al., 2001) y sobre todo, la intensidad (McBride, et al., 1998); (Lovlin, Cottle, Pike, Kavanagh, & Belcastro, 1997).

La diferencia existente entre los 3 grandes grupos de volumen de práctica deportiva queda confirmado con los resultados del test, ya que los sujetos de categoría élite fueron los que alcanzaron la máxima potencia, obteniendo el escalón más elevado en vatios (Ilustración 35), el subgrupo Eli-2 ( $262,5 \pm 15,67$  vatios) aunque con valores muy próximos al de Eli-1 ( $257 \pm 23,60$  vatios), y sin diferencias estadísticas entre ambos. Su justificación se debe a que estos sujetos poseen adaptaciones al entrenamiento tales como el aumento de masa muscular y que se encontraría en relación con la fuerza y velocidad aplicada durante el pedaleo y lo que nos indican la mayor capacidad de producir trabajo muscular de estos sujetos en base a la utilización de sustratos energéticos (Bosco, 2000).

De modo genérico, todos los subgrupos experimentan una disminución la capacidad de generar trabajo muscular (potencia) a medida que incrementa la edad la edad, y por lo tanto, asociada a su vez, con la pérdida de Capacidad Aeróbica (de 0,5 a 1% VO<sub>2</sub>max por año) que experimentamos a lo largo de la vida (Rimmer, 1995).

### 5.4.2. Parámetros fisiológicos

#### - Frecuencia Cardíaca de Recuperación (lpm):

La frecuencia cardíaca tras un esfuerzo, es otro factor determinante del nivel de entrenamiento (Chicharro & Vaquero, (2001)) “La recuperación de la FC después de un esfuerzo protocolizado es más rápida cuanto mayor sea la preparación física o su nivel de entrenamiento del deportista”

Los resultados obtenidos en nuestro estudio (Ilustración 37), indican que el grupo Eli-1, fue el que alcanzó los valores promedio máximos de recuperación de la frecuencia cardíaca al minuto de cese del esfuerzo ( $26,14 \pm 5,59$  ppm), siendo debido a las adaptaciones fisiológicas sufridas por el volumen de práctica deportiva realizada (Chicharro & Vaquero, (2001)) y la edad de dicho subgrupo. Es importante destacar que la recuperación de la FC es menor conforme aumenta la edad del sujeto; avanza independientemente del grupo de práctica deportiva al que pertenezca comportamiento justificado con la pérdida de funcionalidad global fisiológica ligada al proceso de envejecimiento.

#### - Presión arterial sistólica y diastólica (mmHg).

Los valores de presión arterial son un indicativo de posibles factores de riesgo a nivel circulatorio así como de la intensidad de la prueba de esfuerzo realizada (Cononie, et al., 1991; Raglin & Morgan, 1987). En nuestro estudio todos los datos de PAs (Ilustración 38) alcanzados post-esfuerzo se situaban en el rango de 150 a 160 mmHg, reflejando así, la intensidad submáxima de la prueba (Chiacchio Sieiraa, Omar Ricartb, & Suau Estranyc, 2010). Los valores promedio más bajos de PAd (Ilustración 39) en los subgrupos élite

justificando de este modo las adaptaciones cardiovasculares propias de un entrenamiento predominantemente aeróbico (Chicharro & Vaquero, (2001); Eyre, Kahn, & Robertson, 2004).

- Hematocrito.

Los resultados obtenidos en todos los grupos de práctica deportiva y edad, reflejaron un aumento de esta variable post test, como consecuencia de la pérdida de volumen plasmático por la actividad realizada (Ilustración 41). Los subgrupos de categoría élite presentaban menor hemoconcentración debido probablemente a una adaptación al entrenamiento mejorando su volemia, mecanismo de termorregulación y/o de rehidratación celular (Singh M, 2007). Las hemoconcentraciones para todos los subgrupos oscilaron entre 0.8 y 3 %, a excepción de los subgrupos Rec-1 y Rec-2, en los que fueron mayores (4.0 y 3.5 % respectivamente) pudiendo ser esto causa de a la falta de hidratación en el deporte o un reflejo del incorrecto ajuste de cargas en su entrenamiento (Wilmore & Costill, 2007). Aquellos grupos que reflejan un HC entorno al 48% podrían presentar una disminución del rendimiento debido a la falta de fluidez sanguínea. No obstante, estas variaciones no modifican significativamente los valores obtenidos del resto de variables analizadas a excepción de los dos subgrupos con máxima hemoconcentración, en el que podría cambiar alguna significación estadística y que recordaremos en su momento, si fuera necesario.

- Concentración de Lactato (mmol/l).

En lo referente a lo producción de lactato (Ilustración 40), todos los grupos post-esfuerzo experimentaron incrementos significativos, como era de esperar, con valores por encima del Umbral Anaeróbico (4 mmol/l) corroborando nuevamente, junto con las medidas de presión arterial sistólica, el carácter submáximo del test (Powers, 2000). Los valores máximos obtenidos no fueron muy elevados, entre 5 y 8 mmol/l.

Dado que los participantes de los subgrupos de categoría élite fueron los que mayor carga en vatios alcanzaron y por lo tanto, los que realizaron las pruebas de mayor duración, podríamos sugerir, que son éstos, los sujetos con



mayores adaptaciones relacionadas con el metabolismo del ácido láctico y su aclaramiento. Esto podría ser debido probablemente, a que poseen una mayor distribución de fibras musculares lentas oxidativas (Morillas-Ruiz et al., (2005)), por lo que generarían menor producción de lactado al torrente sanguíneo al igual que mejorarían su eficiencia aquellos tejidos consumidores del mismo, (hepático, cardíaco, neuronal y renal).

### 5.4.3. Parámetros de daño sarcomérico

Otro aspecto relacionado con la práctica deportiva y envejecimiento, es el daño que se podría generar sobre las fibras musculares. En este sentido, hemos cuantificado dos proteínas sarcoméricas en plasma por western blot, una indicadora de daño sarcomérico de origen cardíaco, la isoforma cardíaca de Troponina (cTnI) y otra indicadora de daño de sarcomérico, tanto cardíaco como de músculo esquelético ( $\alpha$ -actina).

#### 5.4.3.1. Concentración de $\alpha$ -actina y troponina (cTnI) en suero

En nuestro estudio, observamos un incremento significativo de alfa-actina (Ilustración 42) en todos los grupos, tras someter a los sujetos a una prueba de esfuerzo submáxima, lo que demuestra la generación de microroturas de las fibras musculares activas. Esta alfa-actina, es con toda seguridad de origen sarcomérico de músculo esquelético, ya que las microroturas de músculo cardíaco son mínimas como demuestran los muy bajos valores de la Troponina (cTnI) de origen cardíaco (Ilustración 43). Además, si tenemos en cuenta los valores de hematocrito, los incrementos de alfa actina, no podrían ser consecuencia de la ligera hemoconcentración generada por la prueba de esfuerzo.

El que se produzcan daños celulares durante la actividad física es ineludible y necesario para la instauración de muchas de las adaptaciones fisiológicas. Así, los microtraumas adaptativos de las fibras musculares son los responsables de la inflamación local aguda y de la activación de las células satélite, responsables de la hipertrofia muscular en su fase inicial (Hawke & Garry, 2001). El problema se plantea a la hora de discriminar entre síndrome

de fatiga crónica y el de un daño aceptable y necesario para que se produzcan las adaptaciones sistémicas.

En nuestro estudio, cuando comparamos los valores en reposo de alfa-actina de sujetos sedentarios y recreacionales frente a élites, observamos que estos presentan de 3 a 4 veces mayor concentración en plasma, lo que podría estar relacionado con un acúmulo por las sesiones de entrenamiento y que probablemente participarían junto a otros mecanismos en el mantenimiento de la hipertrofia muscular alcanzada. De hecho, los deportistas de élite obtienen valores en torno a los 12-16  $\mu\text{g/ml}$  tras la actividad submáxima, muy por debajo de los descritos por Amat y colaboradores que utilizaron la  $\alpha$ -actina como marcador de daño muscular (Martínez-Amat, et al., 2005) en atletas con lesiones musculares, que eran superiores a 30-40  $\mu\text{g/ml}$  (Martínez-Amat et al., 2007). Estas diferencias entre nuestros deportistas de élite y los descritos por Amat y colaboradores, indicarían que en nuestro caso, el grado de microtraumas adaptativos estaría relacionado con el mantenimiento de las adaptaciones musculares y no con el síndrome de fatiga crónica.

Los resultados de nuestro estudio, por tanto, revelarían que la alfa-actina sería un buen indicador de microtraumas adaptativos y de la ganancia de masa muscular de atletas y nos permitiría ajustar con más precisión la intensidad y volumen de las sesiones de entrenamiento con las de recuperación y evitar así el síndrome de fatiga crónica. Se realizó una revisión de los parámetros bioquímicos potencialmente útiles para el diagnóstico del síndrome de fatiga crónica en atletas (Petibois, Cazorla, Deleris, & Gin, 2001). Después de un ejercicio intenso, se pueden constatar altas concentraciones plasmáticas de Mioglobina, Creatina Quinasa (CK), malondialdehido y las Vitamina E, C y A, ocasionadas por un daño en miocitos. Estos autores concluyeron que estos marcadores son susceptibles de ser incluidos en el conjunto de test de diagnóstico los más idóneos para detectar daño muscular. No obstante, ninguno de los marcadores analizados, a diferencia de la alfa-actina, es de origen sarcomérico de músculo esquelético sino citosólicos sistémicos, lo que dificulta la posibilidad de discriminar entre fatiga crónica y microtraumas adaptativos.

Otra cuestión relevante, es el grado de microroturas de las células musculares tras la prueba de esfuerzo y la génesis de la misma. Numerosos autores atribuyen la génesis de los microtraumas a una serie de factores, de entre los que parecen más relevantes serían la propia contracción sarcomérica (tanto la acción excéntrica como concéntrica) y/o a la desorganización celular inducida por la presión de las especies reactivas derivadas del oxígeno como consecuencia del incremento metabólico mitocondrial (Hawke & Garry, 2001; Petibois, et al., 2001).

En nuestros sujetos experimentales, la actividad submáxima en cicloergómetro determinó un incremento de alfa-actina (Ilustración 58) con respecto a reposo de 2.55  $\mu\text{g/ml}$  en sedentarios (media de los tres subgrupos) frente a los 3.55  $\mu\text{g/ml}$  en recreacionales (media de los tres subgrupos) y los 5.29  $\mu\text{g/ml}$  en atletas. Esta mayor liberación sérica de esta proteína sarcomérica, determina que el grado de microtraumas adaptativos haya sido mayor en élite que en recreacionales y sedentarios, lo que a su vez vendría justificado porque estos realizaron un mayor trabajo mecánico (43.0, 85.36 y 100.60 kJ en sedentarios, recreacionales y élites respectivamente) y emplearon mayor tiempo en la duración de la prueba (3.9, 6.0 y 6.55 minutos en sedentarios, recreacionales y élites respectivamente).

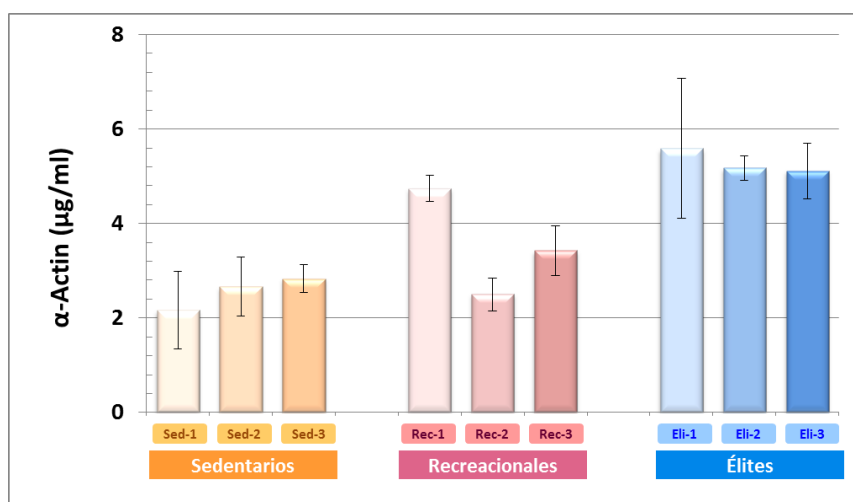


Ilustración 58. Los resultados representan la media  $\pm$ EEM de los incrementos de concentración en suero de la proteína  $\alpha$ -actina de los sujetos de los distintos grupos experimentales en situación reposo y esfuerzo. Los símbolos (descritos en el método) representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  $n=8$  en cada subgrupo

Por otra parte, estas diferencias también podrían atribuirse al estrés metabólico además de al mecánico. De hecho, cuando relacionamos liberación de lactato, como marcador metabólico, frente a la de alfa-actina (ilustraciones 44,45 y 46) observamos que a una misma concentración de lactato, los sujetos sedentarios y recreacionales liberan unas tres veces menos alfa-actina que los atletas. Evidentemente, estos últimos deben de poseer importantes adaptaciones en términos de mayor economía de movimiento y de transportadores monocarboxílicos de lactato (MCT1 y MCT4) (Perrey, S Lambert, Hugon, Mornet, & Mercier, 2005) pero a pesar de ello, parece igual o incluso más relevante el trabajo mecánico realizado por los músculos involucrados, que el metabolismo de los mismos. Ello se justificaría porque los incrementos observados de trabajo y alfa actina, en el grupo de élites, son más elevados que el incremento en liberación de lactato, que es similar en los tres grupos de investigación.

En cualquier caso, la liberación de alfa-actina, tan elevada en élites al concluir la prueba de esfuerzo, pone de manifiesto que el gran trabajo tanto mecánico como metabólico debería de haber incrementado los marcadores de estrés oxidativo, y que al no constatar esto último, nos inclinamos en enfatizar lo comentado anteriormente en el sentido de que en estos sujetos sus mitocondrias son más eficientes y generan menos especies reactivas derivadas del oxígeno.

En cuanto a la liberación plasmática de Troponina I de origen cardiaco, nuestros resultados muestran que el daño de las células contráctiles de este tejido, son mínimas. De hecho los valores obtenidos están en la mayoría de los casos en el límite de detección del instrumento utilizado. Es de destacar que es en los subgrupos Eli-1 y Eli-2 en los que la liberación de Troponina I es mínima.

Por último, no apreciamos que los incrementos de alfa-actina tengan ninguna relación con el envejecimiento, puesto que los valores de reposo y post-esfuerzo, son idénticos tanto en los subgrupos de edad de los sujetos que realizan actividad física (recreacionales y élite) como en los sedentarios.

#### 5.4.4. Parámetros de estrés oxidativo

##### 5.4.4.1. *Daño por estrés oxidativo del ADN de linfocitos periféricos.*

Está ampliamente argumentado que numerosas patologías o enfermedades asociadas al envejecimiento están relacionadas con una deficiencia en la bioenergética mitocondrial. Una de las posibles causas de la alta velocidad de mutación del ADNmit, podría deberse al daño generado por los RL sobre el mismo (Valdez, Alvarez, & Boveris, 1999). Parece ser que esta molécula es diana para las EROs, superando exponencialmente al daño generado sobre el ADN nuclear y por consiguiente, la frecuencia de mutaciones y/o deleciones del ADN mitocondrial es de cinco a diez veces superior (Chance, Sies, & Boveris, 1979), aparentemente debido a la concentración en estado estacionario del  $O_2^-$  mitocondrial, el cual es diez veces superior con respecto al del citosol (Schoffner & Wallace, 1990).

En diversos estudios se han identificado una serie de alteraciones del ADNmit que incluyen mutaciones por sustitución de bases, inserciones, deleciones, mutaciones nucleares que predisponen a las células a las deleciones del ADNmit y a alteraciones del número de copias del mismo (Adachi et al., 1993); (Valdez, et al., 1999) y que pueden provocar graves problemas de salud, como alteraciones del sistema inmunitario, aterosclerosis, cáncer, o acelerando el proceso de envejecimiento (Farooqui, Day, & Zamorano, 1987).

Por este motivo, hemos considerado de gran importancia para nuestro estudio la valoración del daño del ADN nuclear linfocitario, como resultante del estrés general de las células (mitocondrial y citosólico), utilizando para ello la el ensayo COMET, una de las técnicas más sensible para abordar este objetivo.

Nuestros estudios precedentes, realizados en ratas y utilizando esta técnica, apoyan que el aumento de edad conlleva un incremento del daño del ADN linfocitario (aumento del % de ADN en la cola) (Quiles et al., 2005) así como del número de deleciones del ADNmit de distintos tejidos (hígado, corazón y músculo esquelético) (Quiles et al. 2004). Nuestra hipótesis, basada

en la teoría mitocondrial de los radicales libres y relacionada con los estudios sobre ADNmit citados anteriormente, plantea que el mayor volumen de práctica deportiva realizado a lo largo de la vida supondría un mayor consumo de oxígeno mitocondrial y por lo tanto, un mayor daño sobre el ADN de linfocitos periféricos, lo que podría incrementar la susceptibilidad a padecer enfermedades de origen mitocondrial o relacionadas con la misma.

En contra de nuestro planteamiento inicial y a pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas, los sujetos que realizan práctica deportiva tanto de tipo recreacional como élite, muestran en situación de reposo menor daño del ADN con respecto al de sedentarios, e incluso se aprecia cierto descenso conforme aumenta la edad (ilustración 48). No existen estudios longitudinales en humanos que utilicen esta técnica y que nos permitan comparar con nuestros resultados y en cualquier estos no coinciden con los obtenidos por nuestro grupo de investigación en ratas. Es más, el hecho de que los sujetos que realizan práctica deportiva tiendan a disminuir el daño del ADN linfocitario con la edad es para nosotros una gran sorpresa, y lo podríamos atribuir a un posible aumento de la eficiencia de los mecanismos protectores y/o reparadores del ADN, generado probablemente por adaptaciones inducidas por la práctica deportiva regular.

En un estudio que analizó el ADN de linfocitos periféricos de sujetos entrenados frente a no entrenados, no observaron daños al concluir una carrera de 30 minutos al 85% del  $VO_2$ max (Umegaki, Higuchi, Inoue, & Esashi, 1998), pero sin embargo, si aumentó significativamente a los 30 minutos del cese de la misma en el grupo de sujetos no entrenados, apoyando la hipótesis de que la práctica deportiva periódica podría reducir la producción de estrés oxidativo transitorio en el ADN de estas células tras un esfuerzo físico intenso. No obstante, datos indirectos de estudios en ratones, revelan que la activación de los linfocitos por actividad física submáxima y/o extenuante, es capaz de desencadenar una respuesta oxidativa inmediata y cuantificable al concluir la prueba (Azenabor & Hoffman-Goetz, 2000).

Aunque no se presentan diferencias estadísticamente significativas intergrupos, parece que este mecanismo preventivo sería más eficiente en el caso del grupo recreacional frente al élite, apoyando que la práctica crónica

moderada ejerce un efecto protector contra el daño del DNA originado por el ejercicio intenso (Marcos-Becerro & González Gallego, 2002).

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es el efecto de la prueba de esfuerzo submáxima sobre el daño del ADN de linfocitos periféricos según la edad y el volumen de práctica deportiva realizado a lo largo de la vida. Estudios similares que incluyen esta técnica, difieren del nuestro en la tipología de pruebas realizadas para la evaluación; en la mayoría de las investigaciones, los sujetos fueron sometidos a pruebas o test de esfuerzo máximas o actividades físicas de larga duración, en todos los casos de carácter extenuante y donde prevalecía un aumento de daño en el ADN de estas células de forma significativa, tras el ejercicio de alta intensidad.

En nuestro estudio al minuto de concluir la prueba incremental submáxima pudimos apreciar que los resultados referentes al % de ADN en la cola, mostraron en la mayoría de los subgrupos, un ligero aumento con respecto a los valores de reposo sin alcanzar significación en ningún caso (Ilustración 48). Esto podría deberse a que en nuestro caso, la intensidad del esfuerzo a la que fueron sometidos fue submáxima. En un estudio realizado en humanos se observó que tras una ultramaratón de 50 km se produjo un incremento del daño del ADN linfocitario (Mastaloudis, et al., 2004) pero que se restableció tras 2 horas de recuperación. En nuestro caso, aunque la intensidad y duración de la prueba provocó en la mayoría de los casos un leve incremento del daño en el ADN de los linfocitos con respecto a los niveles basales, probablemente se trate de un estrés de tipo transitorio factiblemente reparable a posteriori, tal y como demuestra el estudio anterior.

La mayoría de estudios que relacionan el ADN linfocitario y actividad física, defienden que la práctica aeróbica de larga duración, aumenta el daño post ejercicio de forma significativa en función de la intensidad y duración del ejercicio, siendo menor en actividades submáximas (Wierzba, et al., 2006). Estos estudios justificarían nuestros resultados dado que la prueba de esfuerzo a la que fueron sometidos nuestros sujetos fue de corta duración

Estos mismos estudios estarían en concordancia con los resultados obtenidos en la categoría élite, los cuales mostraron a microscopía de

fluorescencia, mayor pérdida de fragmentos de ADN de la cabeza (Ilustración 47) no significativas, con respecto a los grupos recreacional y sedentario y como consecuencia de una mayor potencia alcanzada y duración de la prueba.

#### *5.4.4.2. Parámetros de peroxidación lipídica*

La peroxidación lipídica se considera un factor esencial en el envejecimiento de las células aeróbicas (Lippman, 1985) siendo ampliamente demostrado que se ve afectada negativamente con la edad. Estudios en los que se determinan fluorescencia, dienos conjugados y malondialdehídos han mostrado mayores niveles de peroxidación lipídica en tejidos de animales viejos respecto al de jóvenes (Sohal RS, 1981); (Floyd, 1984); (Nakano, Oenzil, Mizuno, & Gotoh, 1991; Sohal, 1993), aumentando con la edad la concentración de lipofucsina celular. Se ha demostrado que este proceso se encuentra estrechamente ligado a los factores etiológicos y patogénicos de enfermedades asociadas al envejecimiento (Vladimirov, 1986) y que se precisa de la formación de RL para la iniciación del mismo. En este contexto, cobra gran importancia su evaluación partiendo de la hipótesis de que prácticas deportivas de mayor volumen semanal conllevarían a un mayor consumo de oxígeno y por lo tanto, a una mayor producción de RL, con lo que los niveles de peroxidación lipídica se verían incrementados afectando la vulnerabilidad celular.

Para evaluar el grado de peroxidación lipídica en nuestro estudio hemos utilizado la cuantificación plasmática de hidroperóxidos y de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBAR's) (Ilustraciones 49 y 50)

En nuestros resultados podemos observar el efecto del envejecimiento comparando los diferentes subgrupos de edad y el efecto que el volumen de práctica deportiva ha tenido sobre éstos a lo largo de la vida. Es interesante comprobar como el grupo élite es el que experimenta una tendencia a acumular menos subproductos de la peroxidación lipídica, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas. Al comparar las edades 1 y 3, podemos apreciar un aumento de la generación de sustancias de peroxidación lipídica con la edad, lo que estaría de acuerdo con varios estudios que observan este



comportamiento en diferentes tejidos (Melov, Toussaint, Osiewacz, Lithgow, & Brack, 2000). Aun así, es destacable que el incremento es menos pronunciado en el grupo élite con respecto al grupo recreacional y sedentario. Las concentraciones de TBAR's en reposo del subgrupo Eli-3, mostraron un incremento de 1,29 mmol/ml con respecto a Eli-1, valores bajos si comparamos dicha magnitud en los correspondientes grupos de sedentarios (4,07 mmol/ml) y recreacionales (1,44 mmol/ml). Los incrementos en las concentraciones de ROOH en reposo fueron inferiores que la de TBAR's e igualmente sin presentar diferencias estadísticamente significativas, pero aun así mostraron el mismo patrón con incrementos más bajos en el grupo de mayor volumen de práctica deportiva semanal. Nuestro estudio parece demostrar, en contra de la hipótesis de partida, que son los deportistas con mayor consumo de oxígeno a lo largo de la vida, los que presentan una tendencia a producir menos especies derivadas de la peroxidación lipídica con forme aumenta la edad. Del mismo modo es interesante incidir en el fuerte incremento producido a mediana edad de los grupos sedentarios y recreacionales en reposo y que no ocurre en deportistas de élite. Este aumento, también lo hemos observado en estudios previos de nuestro grupo de investigación realizados en ratas sedentarias y que atribuimos a un fuerte descenso de los sistemas antioxidantes enzimáticos a dicha edad (datos no publicados).

Otro aspecto importante a discutir, es el efecto del test submáximo sobre el proceso de peroxidación lipídica según el volumen de práctica deportiva realizado a lo largo de la vida, hasta el momento del estudio, y que probablemente se afectaría conforme aumentan las edades de los participantes.

En nuestra estudio podemos observar como una prueba incremental submáxima en cicloergómetro de entre 3 a 7 minutos de duración, sin incluir el calentamiento inicial, y de 150 a 300 vatios de potencia alcanzados, produce aumentos en la concentración de TBAR's e hidroperóxidos con respecto a los valores de reposo. Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, la tendencia en todos los subgrupos es al incremento de éstos valores al cese del esfuerzo. Este comportamiento, viene siendo demostrado

desde los años 80, en los que se evidenció que un ejercicio aeróbico de 60 minutos y de intensidad submáxima, ya era suficiente para producir un incremento de la peroxidación lipídica (Tappel & Dillard, 1981). El incremento plasmático de TBAR's (MDA) e hidroperóxidos, tras una práctica o esfuerzo predominantemente aeróbico, ha sido corroborado posteriormente, por numerosos estudios descritos en la tabla 11. Sin embargo, en nuestra situación experimental no existen diferencias estadísticamente significativas post-ejercicio en ninguno de los grupos, lo que podría atribuirse a la corta duración de la prueba y al carácter submáximo de la misma. No obstante, el grado de estrés oxidativo global, en un momento dado, es muy complejo puesto que depende de numerosos factores como son: aporte apropiado de micronutrientes antioxidantes en la dieta, grado de adaptaciones de los mecanismos antioxidantes de defensa y la intensidad y duración de la actividad física.

Según nuestro planteamiento inicial, los sujetos entrenados en modalidades aeróbicas, que utilizan preferentemente el metabolismo oxidativo y poseen generalmente mayor proporción de fibras musculares Tipo I, adquieren valores más altos de consumo de oxígeno, lo que derivaría en una mayor producción de anión superóxido y por lo tanto un mayor estrés oxidativo. A su vez la edad estaría asociada a un acúmulo del déficit mitocondrial lo que sería un importante contribuyente al envejecimiento celular, tisular y del organismo. (Shigenaga TK, 1994). Paradójicamente, son los sujetos de la categoría élite, los que alcanzaron las menores concentraciones de estas sustancias de peroxidación lipídica post esfuerzo. Estos resultados estarían por tanto en contra de la teoría de los radicales libres y en contra de nuestra hipótesis.

Actualmente no existen estudios longitudinales que aborden las posibles adaptaciones fisiológicas inducidas por una práctica deportiva regular mantenida a lo largo de la vida, con respecto a la tasa de subproductos de peroxidación lipídica y su relación con el envejecimiento; tan sólo aparecen en la literatura científica estudios transversales y puntuales en diferentes poblaciones y situaciones que no nos permiten comparar con nuestro estudio.

En una muestra de jóvenes futbolistas de entre 17 y 20 años fue estudiado el efecto del entrenamiento regular con respecto a concentraciones de tioles y MDA y contrastado con un grupo control de jóvenes de la misma franja de edad pero con estilo de vida sedentaria (Metin, Gumustas, Uslu, Belce, & Kayserilioglu, 2003). Los resultados mostraron una disminución de los subproductos de peroxidación lipídica en el grupo de entrenados frente al de sedentarios. A este estudio se suma una revisión sobre deporte y estrés oxidativo (Fisher Wellman & Bloomer, 2009) en la que analizan el efecto en la peroxidación lipídica y la respuesta antioxidante tras un evento deportivo en modalidades predominantemente aeróbicas. Parece ser que deportes como el fútbol americano y el rugby presentan resultados similares tras un partido profesional. En ambos casos se mostró un aumento estadísticamente significativo de la peroxidación lipídica, en deportistas ocasionales frente a entrenados. Así mismo, los valores de peroxidación lipídica en reposo fueron considerablemente menores en los sujetos entrenados frente al grupo control sedentario. De este modo parece demostrarse que los atletas entrenados en modalidades deportivas de este tipo, poseen mayores niveles de protección frente al proceso de peroxidación lipídica, tanto en reposo como en el post esfuerzo. En nuestro caso, también se produce un patrón similar al de éstos estudios, siendo inferiores las concentraciones de estas sustancias en el grupo más entrenado, frente al recreacional y al sedentario, tanto en esfuerzo como en reposo. El hecho de que no existan diferencias estadísticamente significativas podría deberse, como anteriormente comentamos, a la corta duración de la prueba a la que fueron sometidos los sujetos experimentales y al carácter submáximo de la misma.

Con respecto a los sujetos de edad avanzada, (Fatouros, et al., 2004), ha realizado una investigación en personas de entre 65 y 75 años de edad sometidos a un entrenamiento aeróbico regular (3 días en semana durante 16 semanas) al 50-80% de  $FC_{máx}$ . En este estudio se valoraron tanto el nivel de condición física como las concentraciones de MDA, nitrilos, capacidad antioxidante total (TAC) y la actividad de la enzima GPx, al inicio, al finalizar el programa de entrenamiento y a los 4 meses, lo que les permitió valorar tanto el efecto del entrenamiento como del desentrenamiento sobre el estrés oxidativo celular.

Observaron una disminución estadísticamente significativa de los marcadores de estrés oxidativo con respecto a los valores iniciales, y un aumento también estadísticamente significativo de la TAC y la actividad de la GPx, al concluir el programa de entrenamiento. Hay que resaltar además, que todas estas adaptaciones desaparecieron a los 4 meses de desentrenamiento. Por lo tanto, la disminución de subproductos de peroxidación lipídica y del estatus oxidativo en general, podría ser una consecuencia de una adaptación a medio plazo inducida por la práctica deportiva aeróbica regular. Ésta, en principio, también podría ser la justificación del menor perfil de peroxidación lipídica observado en nuestro caso en el grupo de elites, cuyas adaptaciones minimizarían el estrés oxidativo, bien generando menos especies reactivas derivadas del oxígeno o incrementando los mecanismos de defensa y/o de reparación, tal y como sugieren dichos estudios.

#### **5.4.5. Respuesta antioxidante**

En la respuesta del organismo ante los procesos de estrés oxidativo por práctica deportiva, es determinante la cantidad y actividad de antioxidantes en los distintos compartimentos celulares y tisulares.

##### **5.4.5.1. Sistema antioxidante enzimático**

Se ha descrito que el envejecimiento, además de estar ligado a un aumento de la degradación de proteínas y/o a una reducción de su síntesis por el estrés oxidativo, va unido a un descenso gradual de la actividad y/o cantidad de las enzimas antioxidantes en diferentes tejidos y en especial en el músculo esquelético (Melov, et al., 2000). En nuestro estudio, la actividad de las enzimas analizadas, SOD, GPx y GRx (Ilustraciones 51, 53 y 54) en reposo y en los diferentes subgrupos de edad, sigue este comportamiento, mostrando un descenso de la actividad asociado al aumento de edad, que parece atenuarse en los grupos que realizan mayor volumen de práctica deportiva. Sin embargo, la actividad CAT (Ilustración 52) se aparta ligeramente de este patrón, puesto que incrementa a medida que lo hace la edad.

El efecto del envejecimiento, es observado en nuestro estudio por los resultados obtenidos en situación de reposo y en los diferentes subgrupos de

edad. Un estudio que analizó la influencia de un entrenamiento de resistencia (ciclismo), sobre las actividades de SOD, CAT y GPx y que fue medido en eritrocitos de sujetos sedentarios, ciclistas aficionados y ciclistas de élite, obtuvieron, en condiciones de reposo, mayor actividad de las enzimas antioxidantes los deportistas de élite, con diferencias estadísticamente significativas y de forma más acentuada en el caso de la SOD. Tras someterse a una prueba profesional de ciclismo de 22 km, los deportistas élite no mostraron variaciones significativas de las actividades enzimáticas frente a la situación de reposo. Sin embargo al concluir la Vuelta Ciclista a España (2800 km y 20 días), incrementaron la actividad SOD y disminuyeron la actividad CAT, ambas de forma significativa frente al valor reposo. Este estudio demostró que el entrenamiento aeróbico a nivel profesional, produce adaptaciones parciales de las actividades enzimáticas (Mena, et al., 1991). En nuestro estudio son las enzimas GPx y GR (Ilustraciones 53 y 54) las que presentan generalmente mayor actividad enzimática, tanto en reposo como post esfuerzo, lo que se ve más acentuado en el grupo de élites.

Por otro lado, se ha demostrado que la práctica deportiva regular aeróbica induce adaptaciones que incrementan la actividad de las enzimas antioxidantes y reduciendo el proceso de envejecimiento en ratas y en humanos (Alessio & Goldfarb, 1988; Guan, Lui, Morkin, & Eskelson, 2000; L.L. Ji, 1995; Powers, et al., 1994; C. K. Sen, et al., 1994), además de aumentar la concentración de proteínas y los niveles de ARNm en el tipo de fibra muscular involucrado en la actividad física (OH-shi ST, 1997). En un estudio que valoró el efecto de un programa de entrenamiento aeróbico (65-80%  $\text{VO}_2$  max) durante 16 semanas sobre la actividad enzimática eritrocitaria (Elosua, et al., 2003), los participantes fueron sometidos al inicio y al final del programa de entrenamiento a un test submáximo incremental en cicloergómetro, tomando muestras de sangre a los minutos 0, 30, 60, 120 y 24 horas del mismo. Los resultados mostraron un aumento de la actividad de las enzimas SOD, GPx y GR como adaptación al entrenamiento. Al concluir los test submáximos se observó un aumento de la actividad en SOD y GR aunque posteriormente disminuyeron a los 30 y 60 minutos, con tendencia a estabilizarse basalmente a partir de los 120 min; este patrón no se vio afectado por el programa de entrenamiento. En nuestro caso, tras finalizar el test incremental submáximo,

las enzimas que sufren un aumento de su actividad frente a la situación de reposo son la GPx y GR. Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas ni entre situaciones ni entre grupos de estudio, ambas enzimas presentan un comportamiento similar especialmente en el caso del grupo élite, pudiendo ser debido a una mejora de la sinergia entre ambas, fruto de la adaptación al volumen de práctica deportiva realizada.

Es importante resaltar también como la actividad de ambas enzimas se ve altamente incrementada en el grupo Rec-3 post esfuerzo, probablemente como consecuencia de una mayor producción de RL derivada de la intensidad final realizada en el test y/o de la ausencia de adaptaciones enzimáticas.

Con respecto a la actividad de las enzimas SOD y CAT (Ilustraciones 51 y 52), tampoco apreciamos un patrón predecible ni en reposo ni tras esfuerzo, mostrando lo contrario que GPx y GR, un decremento de su actividad tras la prueba de esfuerzo. Sin embargo es destacable la drástica disminución de la actividad CAT en los sujetos élite frente a recreacionales y sedentarios, lo que indicaría que los niveles bajos de peroxidación lipídica en este grupo no se deben a adaptaciones enzimáticas antioxidantes y menos aun en el caso de la CAT. Otros investigadores también observaron un significativo descenso de este enzima en deportistas de élite atribuido a la intensidad (Bergholm et al., 1999) y al volumen de entrenamiento (Mena, et al., 1991).

Hasta el momento, los estudios experimentales descritos, crean controversia al observar comportamientos enzimáticos discordantes. Estas incoherencias podrían venir definidas por la diferencias de duración e intensidad de los programas de entrenamiento utilizados en las investigaciones.

No obstante, en nuestro estudio, la actividad de las enzimas analizadas, en los tres grupos experimentales y en sus correspondientes subgrupos de edad, son pequeñas y de gran variabilidad sin que en ningún momento aparezca algún tipo de significación estadística. En cualquier caso, la actividad de antioxidantes observada en los subgrupos élite no justifica el que estos tengan menores valores de peroxidación lipídica tanto en reposo como tras el esfuerzo, lo que se ve más acentuado en el caso de la CAT que como comentamos anteriormente, desciende drásticamente.

### 5.4.5.2. *Sistema antioxidante no enzimático*

Actualmente las investigaciones dedicadas a relacionar el ejercicio físico y los antioxidantes se centran en dos aspectos diferenciadores; uno de ellos con el objetivo de conocer si la ingesta exógena de antioxidantes disminuye la acción de los Radicales Libres producidos por la práctica deportiva y el otro, con el fin de conocer qué o cuáles antioxidantes podrían no sólo reducir el estrés oxidativo sino aumentar el rendimiento físico. Nuestra investigación se identifica principalmente con el primer objetivo orientado esencialmente a la salud.

En nuestra investigación hemos abordado este tema determinando la concentración de antioxidantes no enzimáticos en plasma como resultante de su mayor o menor utilización en las membranas celulares de todos los tejidos. Por otra parte serían también indicadores de la “capacidad antioxidante total del plasma”. En nuestro caso, hemos analizado las concentraciones de retinol,  $\alpha$ -tocoferol y coenzima Q10 de todos los participantes en situación de reposo y al minuto de cese de la prueba de esfuerzo submáxima incremental, para poder justificar su actuación según el volumen de práctica deportiva y la edad.

En primer lugar, podemos observar (Ilustraciones 55, 56 y 57) que las concentraciones plasmáticas de los tres antioxidantes analizados, están dentro del rango de normalidad tanto en situación de reposo como de esfuerzo, lo que demuestra que los sujetos participantes en el estudio realizaban una ingesta equilibrada en micronutrientes antioxidantes y que a excepción de uno o dos casos (recreacionales mediana edad), ninguno tomaba suplementos vitamínicos.

Los valores en reposo no difieren entre los tres grupos experimentales de una forma destacada, únicamente se diferencian en el rango de concentraciones siendo la mayor para la vitamina E, pero aun así tampoco presentan patrones decisivos para justificar, los datos obtenidos en reposo sobre la peroxidación lipídica.

La prueba de esfuerzo submáxima a la que fueron sometidos los participantes del estudio, produjo variaciones dispares en los antioxidantes analizados. Los valores de retinol y  $\alpha$ -tocoferol sufrieron un comportamiento muy similar elevando su concentración en plasma al minuto de finalización del esfuerzo (Ilustraciones 55 y 56), alcanzando concentraciones más elevadas en el caso de la vitamina E, considerado antioxidante plasmático más efectivo, siendo un gran scavenger y con funciones protectoras ante el ataque de los RL, como la disminución de la fluidez de membrana; esta eficiencia ha sido demostrado tanto in vivo (Burton, 1982) como in vitro (Friden & Lieber, 1992).

Los grupos con mayores incrementos en antioxidantes no enzimáticos fueron los que realizaban habitualmente práctica deportiva, siendo más homogéneo este comportamiento en los sujetos de categoría élite, ya que aquellos de práctica deportiva recreacional disminuyeron sus concentraciones post esfuerzo en algunos casos. El mecanismo por el cual se produce un aumento primordialmente de  $\alpha$ -tocoferol, puede justificarse por la movilización desde diferentes tejidos (tejido adiposo, hígado, bazo, músculo esquelético y otros tejidos) de antioxidantes hacia el torrente plasmático (Pincemail, J y col; 1988; (Parker L, 1989) y reflejando la importancia de la vitamina E para la protección contra el estrés oxidativo del organismo. Los resultados obtenidos en esta investigación apuntan a que se mantuvo el incremento de antioxidantes en plasma al minuto del cese del esfuerzo y no descendió probablemente, por su actuación frente los RL que atacan a las membranas celulares.

Es importante destacar el comportamiento del subgrupo Rec-2 que conteniendo concentraciones basales muy elevadas a diferencia de lo que ocurre en el resto de grupos, lo que probablemente tendría relación con una ingesta dietética no declarada en los cuestionarios iniciales, no obstante, desciende su concentración drásticamente post esfuerzo, mostrando una conducta diferente frente al resto de subgrupos. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la concentración de TBARs (Ilustración 49), el subgrupo Rec-2, también presenta un comportamiento diferente, es el único que experimenta un descenso de las concentraciones post- esfuerzo de MDA; por consiguiente, podríamos sugerir que concentraciones elevadas de este



antioxidante en sangre mediante ingestas exógenas, pudiesen actuar de forma eficiente reduciendo concentraciones de MDA, incluso al minuto de concluir el test.

El nivel de entrenamiento y la intensidad del esfuerzo es capaz de generar diferentes respuestas en las concentraciones plasmáticas de antioxidantes, HDL y lípidos en plasma. Se produce un incremento cuanto mayor es la performance, como refleja el estudio en ciclistas amateur y élites (Aguiló A, 2003) al igual que puede producirse un descenso si la intensidad o duración de la prueba es elevada. Por ello, podemos justificar el leve incremento de antioxidantes presentado en nuestro estudio, por el grupo sedentario.

Por otra parte los resultados obtenidos de la concentración plasmática de coenzima Q10 (Ilustración 57), no muestran ningunas diferencias estadísticamente significativas en ningún caso, por lo que no se ven afectadas ni por la edad ni por la práctica deportiva.

En general, nuestros resultados experimentales no justifican el hecho de que los deportistas del grupo élite presenten menores valores de los marcadores de peroxidación lipídica. No apreciamos adaptaciones encaminadas a mejorar los sistemas de defensa antioxidante, por lo que probablemente, en ellos operan mecanismos tendentes a producir menor peroxidación lipídica a nivel mitocondrial. En este sentido, se nos abre una nueva línea de investigación de gran interés para la relación práctica deportiva de élite y envejecimiento.

Recientemente se ha descrito, que entre otros mecanismos, la hipoxia induce la formación de supercomplejos mitocondriales (Vonck & Schafer, 2009) y/o estimula la fusión mitocondrial (Ding, Ning, Huijun, & Xiaoran, 2010), lo que en conjunto incrementarían la eficiencia energética y la menor formación de especies reactivas. Este mecanismo podría ocurrir en deportistas de élite bien entrenados como una posible adaptación inducida por el tipo de práctica deportiva realizada, pero que en cualquier caso, habría que confirmar con un

Yahira Barranco Ruiz

estudio donde se evaluara al mismo tiempo los marcadores sanguíneos de estrés oxidativo y la bioenergética mitocondrial tras un determinado esfuerzo físico.

## CAPITULO VI. CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. Los marcadores de daño sobre el ADN de linfocitos periféricos (COMET Assay) no difieren entre grupos experimentales (sedentarios, deportistas recreacionales y atletas de élite) ni en reposo ni tras una prueba de esfuerzo submáxima.
2. Los marcadores de daño de membranas celulares, hidroperóxidos y TBARs, son netamente inferiores en deportistas de élite y en los tres subgrupos de edad, aunque de forma no significativa, con respecto a sedentarios y recreacionales.
3. El estudio indica que no se cumple la hipótesis de partida y que ello no parece deberse a los mecanismos de defensa tanto enzimáticos como no enzimáticos analizados, sino probablemente a adaptaciones que conducen a minimizar la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno a nivel mitocondrial.
4. La correlación entre los valores plasmáticos de lactato y alfa-actina durante la prueba de esfuerzo, nos permite deducir que en la instauración de los microtraumas adaptativos cobra algo más de relevancia el trabajo mecánico realizado por la intensidad-duración de la actividad física que el trabajo metabólico.

**Conclusión final:** los atletas de élite, a una edad dada, muestran valores de los parámetros de estrés oxidativo analizados, más beneficios a lo largo de la vida y que podrían contribuir a una mejora estructural y funcional del organismo frente al proceso de deterioro producido por el envejecimiento.



## **CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografia.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abadal, L., C., V. L., Pérez, I., Puig, T., & Balaguer Vintró, I. (2001). Factores de riesgo y morbimortalidad coronaria en una cohorte laboral mediterránea seguida durante 28 años. Estudio de Manresa. *Rev Esp Cardiol.*, 54, 1146-1154.
- Adachi, K., Fujiura, Y., Mayumi, F., Nozuhara, A., Sugiu, Y., Sakanashi, T., . . . Toshima, H. (1993). A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 195, 945-949.
- Aebi, H. (1984). Catalase invitro. [Review]. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Aguiló A, T. P., Guix MP, Villa G, Cordova A, Tur JA y Pons A. . (2003). Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J Nutri Biochem*, 14, 319-325.
- Aldred, S., & Rohalu, M. (2011). A moderate intensity exercise program did not increase the oxidative stress in older adults. [Article]. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 53(3), 350-353. doi: 10.1016/j.archger.2010.12.002
- Alessio, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. [Article]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25(2), 218-224.
- Alessio, H. M., & Goldfarb, A. H. (1988). Lipid-peroxidation and scavenger enzymes during exercise - adaptive response to training. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 64(4), 1333-1336.
- Angeli, A., Minetto, M., Dovio, A., & Paccotti, P. (2004). The overtraining syndrome in athletes: A stress-related disorder. [Review]. *Journal of Endocrinological Investigation*, 27(6), 603-612.
- Anggard, E. (1994). Nitric-oxide - mediator, murderer, and medicine. [Review]. *Lancet*, 343(8907), 1199-1206.
- Aragonés, M. T., Casajús, A., Rodríguez , F., & Cabañas, M. D. (1993). Manual de Cineantropometría ( III Monografía de FEMEDE) (pp. 35-66).
- Aránega, A., González, F. J., Aránega, A. E., Muros, M. A., Fernández, J. E., Vélez, C., Alvarez, L. (1991). Effects of fibric acid derivatives on accumulation of actin in myocardiocytes. *Int J Cardiol*, 33(1), 47-54.
- Aránega, A. E., Reina, A., Velez, C., Alvarez, L., Melguizo, C., & Aránega, A. (1992). Circulating alpha-actin in angina pectoris. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 24, 15-22.
- Aránega, A. E., Reina, A., Velez, C., Alvarez, L., Melguizo, C., & Aránega, A. (1993). Circulating alfa- Actin in Angina Pectoris. . *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29, 15-22.
- Armstrong, L. E., & VanHeest, J. L. (2002). The unknown mechanism of the overtraining syndrome - Clues from depression and psychoneuroimmunology. [Review]. *Sports Medicine*, 32(3), 185-209. doi: 10.2165/00007256-200232030-00003
- Armstrong, R. B., Warren, G. L., & Warren, J. (1991). Mechanisms of exerciseinduced muscle fibre injury. . *Sports Med.*, 12, 184-207.
- Arner, E. S. J., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. [Review]. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6102-6109. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x
- Astrand, P. O. (1987). Exercise physiology and its role in disease prevention and in rehabilitation. [Review]. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 68(5), 305-309.
- Atalay, M., Laaksonen, D. E., Khanna, S., Kaliste-Korhonen, E., Hanninen, O., & Sen, C. K. (2000). Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish

- oil and acute exercise. [Article]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(3), 601-607. doi: 10.1097/00005768-200003000-00008
- Azenabor, A., & Hoffman-Goetz, L. (2000). Effect of exhaustive exercise on membrane estradiol concentration, intracellular calcium, and oxidative damage in mouse thymic lymphocytes. *Free radical biology & medicine* 28(1), 84-90.
- Babior, B. M., & Woodman, R. C. (1990). Chronic granulomatous-disease. [Review]. *Seminars in Hematology*, 27(3), 247-259.
- Balon, T. W., & Nadler, J. L. (1994). Nitric-oxide release is present from incubated skeletal-muscle preparations. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 77(6), 2519-2521.
- Banci, L., Bertini, I., Boca, M., Girotto, S., Martinelli, M., Valentine, J. S., & Vieru, M. (2008). SOD1 and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mutations and Oligomerization. [Article]. *Plos One*, 3(2).
- Barja, G. (2002). Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. [Review]. *Ageing Research Reviews*, 1(3), 397-411. doi: 10.1016/s1568-1637(02)00008-9
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. [Review]. *Physiological Reviews*, 78(2), 547-581.
- Belcastro, A. N., Shewchuk, L. D., & Raj, D. A. (1998). Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol. Cell. Biochemistry*, 179 135-145.
- Berzosa, C., Gomez-Trullen, E. M., Piedrafita, E., Cebrian, I., Martinez-Ballarín, E., Miana-Mena, F. J., . . . Garcia, J. (2011). Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans. [Article]. *European Journal of Applied Physiology*, 111(6), 1127-1133. doi: 10.1007/s00421-010-1738-6
- Bigard, A., Merino, D., Lienhard, F., Serrurier, B., & Guezennec, C. (1997). Muscledamage induced by running training during recovery from hindlimb suspension: the effect of dantrolene sodium. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 76, 421-437.
- Bonow, R., Masoudi, F., Rumsfeld, J., DeLong, E., Estes, N., Goff, D. J., . . . Measures, A. H. A. T. F. o. P. (2008). ACC/AHA classification of care metrics: performance measures and quality metrics: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures. *J Am Coll Cardiol*, Dec 9;52(24), 2113-2117.
- Bosco, C. (2000). *La fuerza muscular: aspectos metodológicos*. Zaragoza.
- Boveris, A., Chance, B., & Oshino, N. (1972). Cellular production of hydrogen-peroxide. [Article]. *Biochemical Journal*, 128(3), 617-&.
- Breton Lesmes, I., Cambor Alvarez, M., de la Cuerda Compes, M. C., & Garcia Peris, P. (2000). Antioxidant micronutrients and human pathology. [English Abstract; ; Review]. [Micronutrientes antioxidantes y patología humana.]. *Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*, 15 Suppl 1, 19-30.
- Brieba, L. G., Carbajal Tinoco, M., Miranda, O., Montano, L. M., RosasOrtiz, O., & Velazquez, S. A. T. (2007). Conformational dynamics in DNA replication selectivity *Advanced Summer School in Physics 2007: Frontiers in Contemporary Physics* (Vol. 960, pp. 113-120). Melville: Amer Inst Physics.
- Bulkley, G. B. (1988). Role of endothelial-cells in free radical-mediated reperfusion injury. [Meeting Abstract]. *Faseb Journal*, 2(5), A1267-A1267.
- Burton, G. W. (1982). First proof that vitamine E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in humand blood plasma. *Lancet*, 11, 327-328.

- Camougrand, N., & Rigoulet, M. (2001). Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. [Article; Proceedings Paper]. *Respiration Physiology*, 128(3), 393-401. doi: 10.1016/s0034-5687(01)00314-0
- Campana, F., Zervoudis, S., Perdereau, B., Gez, E., Fourquet, A., Badiu, C., . . . Koulaloglou, S. (2004). Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis. [Article]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(1), 109-116. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00265.x
- Casado, J. A., Merino, J., Cid J.Subirá, A., & Sanchez- Ibarrola, A. (1996). Oxidantes y radicales libres en Biomedicina. *Rev Med Uni Navarra*, 40(2), 231-240.
- Cazzola, R., Russo-Volpe, S., Cervato, G., & Cestaro, B. (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. [Article]. *European Journal of Clinical Investigation*, 33(10), 924-930. doi: 10.1046/j.1365-2362.2003.01227.x
- Clarkson, P. M., Byrneswc, K. M., McCormick, I. P., & White, J. S. (1986). Muscle soreness and serum creatine kinase activity following isometric, eccentric and concentric exercise. *Int. J. Sports Med.*, 7, 152-165.
- Clarkson, P. M., & Thompson, H. S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? [Article; Proceedings Paper]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 637S-646S.
- Close, G. L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., & MacLaren, D. P. M. (2004). Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. [Article]. *European Journal of Applied Physiology*, 91(5-6), 615-621. doi: 10.1007/s00421-003-1012-2
- Cohen, G., & Heikkila, R. E. (1974). Generation of hydrogen-peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 249(8), 2447-2452.
- Cononie, C. C., Graves, J. E., Pollock, M. L., Phillips, M., Sumners, C., & Hagberg, J. M. (1991). Effect of exercise training on blood-pressure in 70-yr-old to 79-yr-old men and women. [Article]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 23(4), 505-511.
- Covas, M. I., Elosua, R., Fito, M., Alcantara, M., Coca, L., & Marrugat, J. (2002). Relationship between physical activity and oxidative stress biomarkers in women. [Article]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 34(5), 814-819. doi: 10.1097/00005768-200205000-00014
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.*, 59, 527-528.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free-radical biochemistry. [Article]. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493.
- Chiacchio Seiraa, M., Omar Ricartb, A., & Suau Estranyc, R. (2010). Blood pressure response to exercise testing. *Apunts. Medicina de l.*, 45, 191-200
- Chicharro, J. L., & Vaquero, A. H. ((2001)). *Fisiología del Ejercicio*. . Madrid.
- Child, R. B., Wilkinson, D. M., & Fallowfield, J. L. (2001). Effects of a training taper on tissue damage indices, serum antioxidantcapacity and half-marathon running performance. *Journal Sports Med* . 21, 325-331.
- Chung, J. Y., Kang, H. T., Lee, D. C., Lee, H. R., & Lee, Y. J. (2012). Body composition and its association with cardiometabolic risk factors in the elderly: A focus on sarcopenic obesity. *Arch Gerontol Geriatr*, 56(1), 270-278 Epub 2012 Oct 2015.

- Da Silva, J., Herrmann, S. M., Heuser, V., Peres, W., Marroni, N. P., Gonzalez-Gallego, J., & Erdtmann, B. (2002). Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. [Article]. *Food and Chemical Toxicology*, 40(7), 941-947. doi: 10.1016/s0278-6915(02)00015-7
- Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., & Packer, L. (1982). Free-radicals and tissue-damage produced by exercise. [Article]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(4), 1198-1205. doi: 10.1016/s0006-291x(82)80124-1
- Davies, M. A. (1998). *Paper one: Ageing and Health in the 21st Century - An Overview*. Paper presented at the Organización Mundial de la Salud "Ageing and Health: A Global Challenge for the 21st Century", Kobe, Japón, 10 a 13 de noviembre de 1998.
- Decker, K., & Brandsch, R. (1997). Determining covalent flavinylation. [Review]. *Vitamins and Coenzymes, Pt J*, 280, 413-423.
- Demple, B. (1991). *Oxidative stress genes and proteins*. Oxford: Pergamon Press Ltd.
- Diaz, P. T., She, Z. W., Davis, W. B., & Clanton, T. L. (1993). Hydroxylation of salicylate by the in-vitro diaphragm; evidence for hydroxyl radical production during fatigue. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 75(2), 540-545.
- Ding, H., Ning, J., Huijun, L., & Xiaoran, L. (2010). Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. . *Biochimica et Biophysica Acta., Acta 1800*, 250-256.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. [Review]. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Dunlop, M. E., & Muggli, E. E. (2000). Small heat shock protein alteration provides a mechanism to reduce mesangial cell contractility in diabetes and oxidative stress. [Article; Proceedings Paper]. *Kidney International*, 57(2), 464-475. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00866.x
- Duthie, G. G., Gardner, P. T., & Kyle, J. A. M. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? [Article; Proceedings Paper]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(3), 599-603. doi: 10.1079/pns2003275
- Ebashi, S., & Ebashi, F. (1965).  $\alpha$ -actinin, a new structural protein from striated muscle. . *J. Biochem.* , 58, 7-12.
- Elchuri, S., Oberley, T. D., Qi, W. B., Eisenstein, R. S., Roberts, L. J., Van Remmen, H., Huang, T. T. (2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. [Article]. *Oncogene*, 24(3), 367-380. doi: 10.1038/sj.onc.1208207
- Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, J. L., Covas, M. I., Marrugat, J. (2003). Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. [Article]. *Atherosclerosis*, 167(2), 327-334. doi: 10.1016/s0021-9150(03)00018-2
- Ettinger, W. H. (1989). Lipid-levels and risk of atherosclerotic coronary heart-disease in the older person. [Article]. *Medical Clinics of North America*, 73(6), 1525-1530.
- Eyre, H., Kahn, R., & Robertson, R. M. (2004). Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes - A common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. [Review]. *Stroke*, 35(8), 1999-2010. doi: 10.1161/01.str.0000133321.00456.00
- Farooqui, M. Y. H., Day, W. W., & Zamorano, D. M. (1987). Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. *Com.Biochem.Physiol.* , 88B., 177-180.
- Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Villiotou, V., Pouliopoulou, S., Fotinakis, P., Taxildaris, K., & Deliconstantinos, G. (2004). Oxidative stress responses in

- older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc.*, Dec;36(12), 2065-2072.
- Fernández, J. M., Silva-Grigoletto, M. E., & Túnez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio *Rev Andal Med Deporte*, 2(1), 19-34.
- Ferreira, F., Ferreira, R., & Duarte, J. (2007). Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: Influencia do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Rev Port Cien Desp.*
- Feudis, D. (1988). *From chemistry to clinic.*
- Feudis, D. (1991). *Biloba extract: pharmacological activities and clinical applications.* Paris.
- Fiatarone, M. A., Marks, E. C., Ryan, N. D., Meredith, C. N., Lipsitz, L. A., & Evans, W. J. (1990). High intensity strength training in nonagenarians: effects on skeletal muscle. *Journal of the American Medical Association*, 263, 3029-3034.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress - Relationship with exercise and training. [Review]. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358. doi: 10.2165/00007256-200636040-00004
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. [Review]. *Nature*, 408(6809), 239-247. doi: 10.1038/35041687
- Fisher Wellman, K., & Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: A 30 year history. *Dynamic Medicine*, 8(1).
- Floyd, R. (1984). *Free radicals in molecular biology. Aging and disease.* . New York.
- Fragala, M. S., Clark, M. H., Walsh, S. J., Kleppinger, A., Judge, J. O., Kuchel, G. A., & Kenny, A. M. (2012). Gender Differences in Anthropometric Predictors of Physical Performance in Older Adults. *Gen Med.*, pii: S1550-8579(12)00186-6., [Epub ahead of print].
- Frandsen, U., Lopez Figueroa, M., & Hellsten, Y. (1996). Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. [Article]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227(1), 88-93. doi: 10.1006/bbrc.1996.1472
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins - mechanisms of action. *American Journal of Medicine*, 97(S5-S13.).
- Friden, J., & Lieber, R. L. (1992). Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. [Article]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 24(5), 521-530.
- Fry, R. W., Morton, A. R., & Keast, D. (1991). Overtraining in athletes - an update. [Review]. *Sports Medicine*, 12(1), 32-65. doi: 10.2165/00007256-199112010-00004
- Galati, G., & O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. [Review]. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034
- Galván, C. T., Guisado Barrilao, R., García, M. C., Ochoa, J., & Ocaña Wilhelmi, J. (2008). The role of melatonin: Antioxidantes y ejercicio físico: Funciones de la melatonina. *Revista Andaluza De Medicina Del Deporte*, 1(2), 61-72.
- Geleijnse, J. M., Launer, L., van der Kuip, D. A. M., Hofman, A., & Witteman, J. C. M. (2002). Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. [Article]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), 880-886.
- Gennuso, K. P., Zalewski, K., Cashin, S. E., & Strath, S. J. (2012). Resistance Training Congruent with Minimal Guidelines Improves Function in Older Adults: A Pilot Study. *J Phys Act Health.* , Epub ahead of print.

- Goldfarb, A. H., McIntosh, M. K., & Boyer, B. T. (1996). Vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 80(2), 486-490.
- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., & Vina, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. [Article]. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 126-131.
- Greenwal, R. A., & Schwartz, C. E. (1974). Complex-formation between lysozyme and cartilage proteoglycans. [Article]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 359(1), 66-72. doi: 10.1016/0005-2795(74)90132-9
- Griffith, O. W., & Meister, A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(14), 4668-4672. doi: 10.1073/pnas.82.14.4668
- Guan, Z. J., Lui, C. Y., Morkin, E., & Eskelson, C. D. (2000). Oxidative stress in ethanol-induced cardiomyocyte apoptosis. [Meeting Abstract]. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(2), 169A-169A.
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. [Review]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.071
- Hakim, A. A., Petrovitch, H., Burchfiel, C. M., Ross, G. W., Rodriguez, B. L., White, L. R., Abbott, R. D. (1998). Effects of walking on mortality among nonsmoking retired men. *N Engl J Med*, 338(2), 94-99.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). [Article; Proceedings Paper]. *Free Radical Research*, 31(4), 261-272. doi: 10.1080/10715769900300841
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. [Article; Proceedings Paper]. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147-1150.
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid-peroxidation - its mechanism, measurement, and significance. [Article; Proceedings Paper]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), S715-S725.
- Harman, D. (1956). Aging - a theory based on free-radical and radiation-chemistry. [Article]. *Journals of Gerontology*, 11(3), 298-300.
- Hawke, T. J., & Garry, D. J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. [Review]. *Journal of Applied Physiology*, 91(2), 534-551.
- Heath, G. W., Macera, C. A., & Nieman, D. C. (1992). Exercise and upper respiratory-tract infections - is there a relationship. [Article]. *Sports Medicine*, 14(6), 353-365. doi: 10.2165/00007256-199214060-00003
- Hellsten, Y., Frandsen, U., Orthenblad, N., Sjodin, B., & Richter, E. A. (1997). Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: A role in inflammation. [Article]. *Journal of Physiology-London*, 498(1), 239-248.
- Heng, Y., Yasunaga, T., & Wakabayashi, T. (1995). Determination of the protein components of native thin filaments isolated from natural actomyosin: nebulin and alpha-actinin are associated with actin. *J. Biochem* 118 422-427.
- Hernández Torres, A. (2004). *Niveles urinarios de los productos de peroxidación lipídica : acción antioxidante en el organismo humano del tratamiento crenoterápico con aguas sulfuradas y peloides.*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Hertog, M. G. L., Bueno de Mesquita, H. B., Fehily, A. M., Sweetnam, P. M., Elwood, P. C., & Kromhout, D. (1996). Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the caerphilly study. [Article]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 5(9), 673-677.

- Heyden, S., & Fodor, G. J. (1988). Does regular exercise prolong life expectancy. [Article]. *Sports Medicine*, 6(2), 63-71.
- Hodnick, W. F., Milosavljevic, E. B., Nelson, J. H., & Pardini, R. S. (1988). Electrochemistry of flavonoids - relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. [Article]. *Biochemical Pharmacology*, 37(13), 2607-2611. doi: 10.1016/0006-2952(88)90253-5
- Holmgren, A. (1977). The function of thioredoxin and glutathione in deoxyribonucleic acid synthesis. *Biochem Soc Trans* 5, 611-612.
- Howell, R. R., & Wyngaarden, J. B. (1960). Mechanism of peroxidation of uric acids by hemoproteins. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 235(12), 3544-3550.
- Huertas, J. R., Mataix, F. J., Manas, M., Bargossi, A. M., & Battino, M. (1994). Dietary polyunsaturated fatty-acids and peroxidative risks in sport practice - alternatives. [Article]. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 34(2), 101-108.
- Hwang, C., Sinskey, A. J., & Lodish, H. F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum. [Article]. *Science*, 257(5076), 1496-1502. doi: 10.1126/science.1523409
- ISAK. (2001). International Standards for Anthropometric Assessment: ISAK.
- Jackson, M. J., & Ofarrell, S. (1993). Free-radicals and muscle damage. [Article]. *British Medical Bulletin*, 49(3), 630-641.
- Jenkins, R. R. (1988). Free-radical chemistry - relationship to exercise. [Review]. *Sports Medicine*, 5(3), 156-170. doi: 10.2165/00007256-198805030-00003
- Ji, L. L. (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc. Sport Sci. Rev*, 23, 135-166.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. [Article; Proceedings Paper]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222(3), 283-292. doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-145.x
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C. S., & Wolff, S. P. (1990). Hydrogen-peroxide production during experimental protein glycation. [Article]. *Febs Letters*, 268(1), 69-71. doi: 10.1016/0014-5793(90)80974-n
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. [Review]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(4), C849-C868. doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008
- Jungersen, L., Wall, B., & Wennmalm, A. (1996). Physical fitness regulates nitric oxide formation in healthy man. [Meeting Abstract]. *Circulation*, 94(8), 2912-2912.
- Kagan, V. E., Serbinova, E. A., Koynova, G. M., Kitanova, S. A., Tyurin, V. A., Stoytchev, T. S., . . . Packer, L. (1990). Antioxidant action of ubiquinol homologs with different isoprenoid chain-length in biomembranes. [Article]. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(2), 117-126. doi: 10.1016/0891-5849(90)90114-x
- Karp, G. (2005). *Cell and molecular biology: concepts and experiments* (Vol. 1996-416). New York: John Wiley & Sons.
- Khanna, S., Atalay, M., Laaksonen, D. E., Gul, M., Roy, S., & Sen, C. K. (1999). alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 86(4), 1191-1196.
- Khawli, F. A., & Reid, M. B. (1994). N-acetylcysteine depresses contractile function and inhibits fatigue of diaphragm in-vitro. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 77(1), 317-324.
- Koide, T., Wieloch, T., & Siesjo, B. K. (1985). Circulating catecholamines modulate ischemic brain-damage. [Meeting Abstract]. *Acta Neurologica Scandinavica*, 72(2), 265-266.

- Konstantinos, M., G., F., A.Z., J., Nikolaidis, M. G., Douroudos, J., Chatzinikolaou, A., Kouretas, D. (2007). Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: Implications for diagnosis. *Free Radical Biology & Medicine* 43 901 – 910.
- Lakka, T. A., Venalainen, J. M., & Rauramaa, R. (1994). Relation of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness to the risk of acute myocardial infarction in men. *New Eng J Med*, 330(22), 1549-1554.
- Lee, T. K., Hammond, C. L., & Ballatori, N. (2001). Intracellular glutathione regulates taurocholate transport in HepG2 cells. [Article]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 174(3), 207-215. doi: 10.1006/taap.2001.9208
- Lehmann, M., Huonker, M., Dimeo, F., Heinz, N., Gastmann, U., Treis, N., . . . Haussinger, D. (1995). SERUM AMINO-ACID-CONCENTRATIONS IN 9 ATHLETES BEFORE AND AFTER THE 1993 COLMAR ULTRA TRIATHLON. [Article]. *International Journal of Sports Medicine*, 16(3), 155-159
- Lexell, J., Taylor, C., & Sjostrom, M. (1988). What is the cause of aging atrophy? Total number, size and proportion of different fibre types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year old men. *J.Neurolog. Sci.* 84, 275-294.
- Li, Y. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet*, 11, 376-381.
- Lieber, R., & Friden, J. (1999). Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction. *J. Sci. Med. Sport*, 2, 253-265.
- Lippman, R. D. (1985). Rapid in vitro quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbit and man. *Exp. Gerontol.*, 20, 1-15.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pike, I., Kavanagh, M., & Belcastro, A. (1997). Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 56, 313-316.
- Luengo, J., Egocheaga, J., Egocheaga, J., & Dell Valle, M. (2000). Estudio Kinantropométrico de nadadores crolistas de élite española. *Rev. Esp. Antrop. Biol.* , 21, 41-49.
- Mahler, D. A., Cunningham, D. P. E., & Curfman, G. D. (1986). Aging and exercise performance. *Clinical Geriatric Medicine*, 2, 433-452.
- Maples, K. R., Jordan, S. J., & Mason, R. P. (1988). In vivo rat hemoglobin thyl free-radical formation following administration of phenylhydrazine and hydrazine-based drugs. [Article]. *Drug Metabolism and Disposition*, 16(6), 799-803.
- Marcos-Becerro, D., & González Gallego, J. (2002). The stress proteins. their relationship with tumors, aging and exercise (II). *Archivos de Medicina del Deporte (FEMEDE)*, XIX, 91401-408.
- Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2009). Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. [Review]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 2685-2700. doi: 10.1089/ars.2009.2695
- Marrugat, J., Elosua, R., Covas, M., Molina, L., & Rubiés-Prat, J. (1996). Amount and intensity of physical activity, physical fitness, and serum lipids in men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol.* , 143(6), 562-569.
- Martínez-Amat, A., Boulaiz, H., Prados, J., Marchal, J. A., Padial Puche, P., Caba, O., Aránega, A. (2005). Release of a-actin into serum after skeletal muscle damage. *Br J Sports Med* 39, 830–834.
- Martínez-Amat, A., Marchal Corrales, J. A., Rodríguez Serrano, F., Boulaiz, H., Prados Salazar, J. C., Hita Contreras, F., Aranega Jimenez, A. (2007). Role of a-actin in muscle damage of injured athletes in comparison with traditional markers. *Br J Sports Med* 41, 442–446.



- Marzatico, M., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., & De la Valle, G. (1997). Blood free radical antioxidants enzymes and lipid peroxides following long distance and lactademic performance in hyhgly trained aerobic and sprint atheletes. *J Sport Med Phys Fitness*, 37, 235-239.
- Maslach, C., & Jackson, S. E. (1981). The measurement of experienced burnout. [Article]. *Journal of Occupational Behaviour*, 2(2), 99-113. doi: 10.1002/job.4030020205
- Mastaloudis, A., Leonard, S. W., & Traber, M. G. (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. [Article; Proceedings Paper]. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(7), 911-922. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00667-0
- Mastaloudis, A., Yu, T. W., O'Donnell, R. P., Frei, B., Dashwood, R. H., & Traber, M. G. (2004). Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. [Article; Proceedings Paper]. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(8), 966-975. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.012
- Mataix, J., Manas, M., Quiles, J., Battino, M., Cassinello, M., LopezFrias, M., & Huertas, J. R. (1997). Coenzyme Q content depends upon oxidative stress and dietary fat unsaturation. [Article; Proceedings Paper]. *Molecular Aspects of Medicine*, 18, S129-S135.
- Mataix, J., Quiles, J. L., Huertas, J. R., Battino, M., & Mañas, M. (1998). Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, vitamine E in lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 24(4), 511-521.
- Matuszczak, Y., Farid, M., Jones, J., Lansdowne, S., Smith, M. A., Taylor, A. A., & Reid, M. B. (2005). Effects of N-acetylcysteine on glutathione oxidation and fatigue during handgrip exercise. [Article]. *Muscle & Nerve*, 32(5), 633-638. 5
- Mazzeo, R. S., Cavanagh, P., Evans, W. J., Fiatarone, M., Hagberg, J., McAuley, E., & Startzell, J. (1998). Exercise and physical activity for older adults. [Review]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30(6), 992-1008.
- McArdle, W., Katch, F., & Katch, V. (1996). *Exercise Physiology 4th*.
- McBride, J., Kraemer, W., Triplett- McBride, T., & Sebastianelli, W. (1998). Effect of resistance exercise on free radical production. *Med Sci Sport Exerc*, 30, 67-72.
- McCord, J. M. (1989). Oxygen-derived free-radicals in postischemic tissue-injury. [Meeting Abstract]. *Clinical Chemistry*, 35(6), 1049-1050.
- McCullagh, R., Fitzgerald, E., Martin, R., Kennedy, C., O'Reilly, N., O'Connor, K., & Timmons, S. (2012). An augmented exercise programme in the acute setting can improve mobility and quality of life in frail hospitalised older patients: A pilot trial. [Meeting Abstract]. *Journal of Aging and Physical Activity*, 20, S218-S219.
- Melov, S., Toussaint, O., Osiewacz, H. D., Lithgow, G. J., & Brack, C. (2000). Mitochondrial oxidative stress - Physiologic consequences and potential for a role in aging *Molecular and Cellular Gerontology* (Vol. 908, pp. 219-225). New York: New York Acad Sciences.
- Mena, P., Maynar, M., Gutierrez, J. M., Maynar, J., Timon, J., & Campillo, J. E. (1991). Erythrocyte free-radical scavenger enzymes in bicycle professional racers - adaptation to training. [Article]. *International Journal of Sports Medicine*, 12(6), 563-566. doi: 10.1055/s-2007-1024734
- Metin, G., Gumustas, M. K., Uslu, E., Belce, A., & Kayserilioglu, A. (2003). Effect of regular training on plasma thiols, malondyaldehyde and carnitine concentration in young soccer players. *Clin J Physiol*, 46, 35-39.
- Miquel, J., Economos, A., & Fleming, J. (1980). Mitochondrial role in cell aging. . *Exp. Gerontol.*, 15, 575-591.

- Miquel, J., & Ramírez-Bosca, A. (2004). Oxidative stress and antioxidant diet supplementation in ageing, atherosclerotic and immune dysfunction processes. *Ars Pharm*, 45 (2), 91-109.
- Monte, M. (1994). Radicales libres del oxígeno y superóxido dismutasas: Aspectos bilógicos y médicos. *Medicina (Buenos Aires)*, 54, 61-68.
- Morillas-Ruiz, J., Zafrilla, P., Almar, M., Cuevas, M. J., López, F. J., Abellan, P., & González-Galleto, J. ((2005)). The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: Results from a placebocontrolled doubleblind study in cyclists. . *European Journal of Applied Physiology*, 95(5–6), 543–549.
- Nakagawa, K., Fujimoto, K., & Miyazawa, T. (1996). beta-Carotene as a high-potency antioxidant to prevent the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice. [Article]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1299(1), 110-116. doi: 10.1016/0005-2760(95)00203-0
- Nakano, M., Oenzil, F., Mizuno, T., & Gotoh, S. (1991). Aged related changes in the lipofuscin accumulation of brain and heart *Int J Exp Clin Gerontol*, 41(2), 69-79.
- Nederhof, E., Lemmink, K., Visscher, C., Meeusen, R., & Mulder, T. (2006). Psychomotor speed - Possibly a new marker for overtraining syndrome. [Article]. *Sports Medicine*, 36(10), 817-828. doi: 10.2165/00007256-200636100-00001
- Niess, A. C., Dickhuth, H. H., Northoff, H., & Fehrenbach, E. (1999). Free radicals and oxidative stress in exercise - Immunological aspects. [Review]. *Exercise Immunology Review*, 5, 22-56.
- Nieto, N. (1993). *Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas*. universidad de Granada, Granada.
- Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., & Gotoh, N. (1995). Interaction among vitamin-c, vitamin-e, and beta-carotene. [Article; Proceedings Paper]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), S1322-S1326.
- Nocon, M., Hiemann, T., Muller-Riemenschneider, F., Thalau, F., Roll, S., & Willich, S. (2008). Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and metaanalysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.*, 15, 239–246.
- Ogonovszky, H., Berkes, I., Kumagai, S., Kaneko, T., Tahara, S., Goto, S., & Radak, Z. (2005). The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. [Article]. *Neurochemistry International*, 46(8), 635-640. doi: 10.1016/j.neuint.2005.02.009
- OH-shi ST, K., T, Ookawara T, Sakurai N, Izawa, N y Ohno N. (1997). Endurance training improves the resistance of rats diaphragm to exercise induced oxidative stress. *Am J Resp Crit Care Med*, 156, 1579-1585.
- Okamura, K., Doi, T., Hamada, K., Sakurai, M., Yoshioka, Y., Mitsuzono, R., . . . SugawaKatayama, Y. (1997). Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans. [Article]. *Free Radical Research*, 26(6), 507-514.
- Okutsu, M., Ishii, K., Niu, K. J., & Nagatomi, R. (2005). Cortisol-induced CXCR4 augmentation mobilizes T lymphocytes after acute physical stress. [Article]. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 288(3), R591-R599.
- Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., & Nicotera, P. (1989). Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. [Review]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10(7), 281-285.

- Parker L, A. A., Rothfuss, LM y Wilson DS. (1989). Modulation of tissue vitamin E levels by physical exercise. . *Ann NY Acad Sci*, 570, 311-321.
- Peeze-Binkhorst, F. M., Kuipers, H., Tangelder G.J, Slaaf, D. W., & Reneman, R. S. (1989). Exercise-induced focal skeletal muscle fiber degeneration and capillary morphology. . *J. Appl. Physiol.*, 66, 2857-2865.
- Pelouch, V. (1995). Molecular aspects of regulation of cardiac contraction. . *Physiol. Res.*, 44, 53-60.
- Perrey, T., Lambert, K., Hugon, J., Mornet, D., & Mercier, J. (2005). Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. *J. J Appl Physiol.*, 98, 804–809.
- Petibois, C., Cazorla, G., Deleris, G., & Gin, H. (2001). Clinical diagnosis of overtraining using blood tests: current knowledge. [Article]. *Revue De Medecine Interne*, 22(8), 723-736.
- Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Limet, R. (1996). Oxidative stress in clinical situations : fact or fiction ? . *Europ J Anaesth*, 13, 219-234.
- Powell, K. E., Thompson, P. D., Caspersen, C. J., & Kendrick, J. S. (1987). Physical-activity and the incidence of coronary heart-disease. [Review]. *Annual Review of Public Health*, 8, 253-287. doi: 10.1146/annurev.publhealth.8.1.253
- Powers, S. K. (2000). Fundamentos del metabolismo energético. In Paidotribo (Ed.), *Manual de consulta para el control y la prescripción del ejercicio*. American College of Sports Medicine. España.
- Powers, S. K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L. L., Martin, D., Herb, R. A., & Dudley, G. (1994). Influence of exercise and fiber-type on antioxidant enzyme-activity in rat skeletal-muscle. [Article]. *American Journal of Physiology*, 266(2), R375-R380.
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. [Review]. *Physiological Reviews*, 88(4), 1243-1276. doi: 10.1152/physrev.00031.2007
- Quiles, J. L., Huertas, J. R., Mañas, M., Battino, M., Casinello, M., Litarru, G. P., . . . Mataix, J. (1994). Peroxidative extent and Coenzyme Q levels in the rat: Influence of physical training and dietary fats. *Molecular Aspects of Medicine*. , 15, 89-95.
- Quiles, J. L., Huertas, J. R., Mañas, M., Battino, M., Ochoa, J. J., & Mataix, J. (1998). Plasma antioxidants are strongly affected by lipid peroxidation in rats under physical exercise and different dietary fats. *BioFactors*, 18, 119-127.
- Quiles, J. L., Huertas, J. R., Mañas, M., Ochoa, J. J., Battino, M., & Mataix, J. (1999a). Oxidative stress induced by exercise and dietary fat modulates the coenzyme Q and vitamin A balance between plasma and mitochondria *Int. J. Vitam. Nutr.*, 69(4), 243-249.
- Quiles, J. L., Huertas, J. R., Mañas, M., Ochoa, J. J., Battino, M., & Mataix, J. (1999b). Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil *The British journal of nutrition*, 81, 21-24.
- Quiles, J. L., Huertas, J. R., Mañas, M., Ochoa, J. J., Battino, M., & Mataix, J. (2001). Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on the specific tissue in the rat. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(2)(127-134).
- Quiles, J. L., Huertas, J. R., Ochoa, J. J., Battino, M., Mataix, J., & Mañas, M. (2003). Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. *Nutrition*, 19 363-368.
- Quiles, J. L., Ochoa, J. J., M., B., Gutierrez-Rios, P., Nepomuceno, E. A., Frias, M. L., Mataix, J. (2005). Life-long supplementation with a low dosage of coenzyme

- Q10 in the rat: effects on antioxidant status and DNA damage. *BioFactors*, 25(1-4): , 73-86.
- Quiles, J. L., Ochoa, J. J., Ramírez-Tortosa, M. C., Battino, M., Huertas, J. R., Martín, Y., & Mataix, J. (2004). Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA doublestrand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats *Experimental Gerontology*, 39(1189-1198).
- Quiles, J. L., Ochoa, J. J., Ramirez-Tortosa, M. C., Huertas, J. R., & Mataix, J. (2006). Age-related mitochondrial DNA deletion in rat liver depends on dietary fat Unsaturation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61(2), 107-114.
- Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. (2005). Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. [Editorial Material]. *Biogerontology*, 6(1), 71-75.
- Raglin, J. S., & Morgan, W. P. (1987). Influence of exercise and quiet rest on state anxiety and blood-pressure. [Article]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 19(5), 456-463.
- Reas, D. L., Nygård, J. F., Svensson, E., Sørensen, T., & Sandanger, I. (2007). Changes in body mass index by age, gender, and socio-economic status among a cohort of Norwegian men and women (1990–2001). *BMC Public Health* 7(269).
- Reid, M. B. (2008). Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. [Review]. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 169-179. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.002
- Reid, M. B., Khawli, F. A., & Moody, M. R. (1993). Reactive oxygen in skeletal-muscle. Contractility of unfatigued muscle. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 75(3), 1081-1087.
- Rimm, E. B., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (1996). Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. [Article]. *Annals of Internal Medicine*, 125(5), 384-389.
- Rimmer, J. H. (1995). Safety and medical considerations when prescribing exercise for a frail elderly population. [Meeting Abstract]. *Journal of Aging and Physical Activity*, 3(4), 417-417.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362(6423), 801-809.
- Rusanova, I., Escames, G., Cossio, G., de Borace, R. G., Moreno, B., Chahboune, M., . . . Acuna-Castroviejo, D. (2010). Oxidative stress status, clinical outcome, and beta-globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. [Article]. *European Journal of Haematology*, 85(6), 529-537.
- Sabán Ruíz, J. (2009). Control global del riesgo cardiometabólico: la disfunción endotelial como diana preferencial. In D. d. S. S.A (Ed.). Madrid.
- Sastre, J., Pallardó, F., & Viña, J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *Life*, 49, 1-9.
- Schippinger, G., Wonisch, W., Abuja, P. M., Fankhauser, F., Winklhofer-Roob, B. M., & Halwachs, G. (2002). Lipid peroxidation and antioxidant status in professional American football players during competition. [Article]. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(9), 686-692.
- Schoffner, J., & Wallace, D. (1990). Mitochondrial genetics: principles and practice. *Adv Hum Genet.*, 19, 267-268.
- Schroder, H., Navarro, E., Mora, J., Galiano, D., & Tramullas, A. (2001). Effects of alpha-tocopherol, beta-carotene and ascorbic acid on oxidative, hormonal and enzymatic exercise stress markers in habitual training activity of professional basketball players. [Article]. *European Journal of Nutrition*, 40(4), 178-184.

- Sen, C. K., Atalay, M., & Hanninen, O. (1994). Exercise-induced oxidative stress - glutathione supplementation and deficiency. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 77(5), 2177-2187.
- Sen, C. K., & Packer, L. (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. [Article; Proceedings Paper]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 653S-669S.
- Senger, R., & Goldman, W. H. (1995). The influence of cations and ionic strength on actin polymerization in the presence/absence of alpha-actinin. *Biochem. Mol. Biol.*, 35, 103-191.
- Sentman, M. L., Granstrom, M., Jakobson, H., Reaume, A., Basu, S., & Marklund, S. L. (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. [Article]. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 6904-6909. doi: 10.1074/jbc.M510764200
- Shigenaga TK, H. T. A. B. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Pro Nalt Acad Sci USA*, 91, 1771-1778.
- Shindoh, C., Dimarco, A., Thomas, A., Manubay, P., & Supinski, G. (1990). Effect of n-acetylcysteine on diaphragm fatigue. [Article]. *Journal of Applied Physiology*, 68(5), 2107-2113.
- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress - damage to intact-cells and organs. [Article]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 311(1152), 617-631. doi: 10.1098/rstb.1985.0168
- Simon, J.A., & Hudes, E.S. (2000). Serum ascorbic acid and gallbladder diseasedprevalence among US adults. *Arch. Intern. Med.*, 160(931-936).
- Simonschnass, I., & Korniszewski, L. (1990). The influence of vitamin-e on rheological parameters in high-altitude mountaineers. [Article]. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 60(1), 26-34.
- Singh M, P. J., Ahern SM, Strobel NA, Willson G, Jenkins DG & Coombes JS. (2007). The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Apply Physiol Nutri Metab*, 32, 667-685.
- Smith, C., & Myburgh, K. H. (2006). Are the relationships between early activation of lymphocytes and cortisol or testosterone influenced by intensified cycling training in men? [Article]. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme*, 31(3), 226-234.
- Smith, L. L. (2000). Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? [Article]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(2), 317-331.
- Smith, L. L. (2003). Overtraining, excessive, exercise, and altered immunity - Is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? [Review]. *Sports Medicine*, 33(5), 347-364.
- Snow, M. H. (1977). Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing I. A fine structural study. *Anat. Rec*, 188, 181-199.
- Sohal, R. (1993). The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clin Exp Res* 5, 3-17.
- Sohal RS, D. H., Biehl ER. (1981). Effect of age and metabolic rate on lipid peroxidation in the housefly, *Musca Domestica*. *Mech Ag Dev* 16, 159-167.
- Tappel, A. L., & Dillard, C. J. (1981). In vivo Lipid-peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamine E. [Article]. *Federation Proceedings*, 40(2), 174-178.
- Umegaki, K., Higuchi, M., Inoue, K., & Esashi, T. (1998). Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained

- and untrained men. [Article]. *International Journal of Sports Medicine*, 19(8), 581-585.
- Valdez, L., Alvarez, S., & Boveris, A. (1999). ADN: estructura y daño oxidativo. *Antioxidantes y Calidad de Vida.*, 10pp.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. [Review]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84
- Vicent, K. R., Braith, R. W., Lennon, S. L., & Lowenthal, D. T. (2002). Resistance exercise training attenuates exercise-induced lipid peroxid. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 87, 416-423.
- Vina, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C., Asensi, M., Pallardo, F. V., . . . Repine, J. E. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; Role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. [Article]. *Iubmb Life*, 49(6), 539-544.
- Viru, A., & Viru, M. (2003). *Análisis y control del rendimiento deportivo*. Barcelona.
- Vladimirov, Y. A. (Ed.). (1986). *Free radical lipid peroxidation in biomembranes: mechanism, regulation and biological consequences*. New York: Alan R Liss.
- Vonck, J., & Schafer, E. (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial intermembrane. *Biochimica et Biophysica Acta.* , 1793, 117-124.
- Wayner, D. D. M. (1987). Radical-trapping antioxidants invitro and invivo. [Article]. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 18(1-3), 219-229.
- Weiss. (1989). Tissue Destruction by Neutrophils. *New Engl J Med*, 320, 365-376.
- Welbourn, C. R. B., Goldman, G., Paterson, I. S., Valeri, C. R., Shepro, D., & Hechtman, H. B. (1991). Pathophysiology of ischemia reperfusion injury - central role of the neutrophil. [Review]. *British Journal of Surgery*, 78(6), 651-
- White, R. J., & Reynolds, I. J. (1996). Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: An early signal specific to excitotoxin exposure. [Article]. *Journal of Neuroscience*, 16(18), 5688-5697.
- Wierzbica, T. H., Olek, R. A., Fedeli, D., & Falcioni, G. (2006). Lymphocyte dna damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. [Article]. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57, 115-131.
- Wilmore, J. H., & Costill, D. L. (2007). *Fisiología del esfuerzo y del deporte*. 6ª edición. Badalona (España).
- Williams, M. H. (2002). *Nutrición para la salud, la condición física y el deporte*. Barcelona.
- Winrow, V. R., Winyard, P. G., Morris, C. J., & Blake, D. R. (1993). Free-radicals in inflammation - 2nd messengers and mediators of tissue destruction. [Article]. *British Medical Bulletin*, 49(3), 506-522.
- Witing, L. (1980). *Vitamine E and lipid antioxidants in free radical initiated reaction*. London: Free Radicals in biology.
- Wolbarsht, M. L., & Fridovich, I. (1989). Hyperoxia during reperfusion is a factor in reperfusion injury. [Article]. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(1), 61-62.