

César Berzosa Sánchez

Estudio del daño oxidativo, niveles
de defensas antioxidantes y efecto
ergogénico de la melatonina en
pruebas de esfuerzo físico agudo

Departamento
Farmacología y Fisiología

Director/es

Fuentes Broto, Lorena
Martínez Ballarín, Enrique
Gómez Trullén, Eva M

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO, NIVELES DE DEFENSAS
ANTIOXIDANTES Y EFECTO ERGOGÉNICO DE LA
MELATONINA EN PRUEBAS DE ESFUERZO FÍSICO AGUDO

Autor

César Berzosa Sánchez

Director/es

Fuentes Broto, Lorena
Martínez Ballarín, Enrique
Gómez Trullén, Eva M

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Farmacología y Fisiología

2011

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA



Universidad
Zaragoza

**ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO, NIVELES DE
DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y EFECTO ERGOGÉNICO
DE LA MELATONINA EN PRUEBAS DE ESFUERZO
FÍSICO AGUDO**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
D. César Berzosa Sánchez
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EUROPEO
Zaragoza, 2011

EVA M^a GÓMEZ TRULLÉN, Profesora Colaboradora del Departamento de Fisiatria y Enfermeria de la Universidad de Zaragoza,

LORENA FUENTES BROTO, Profesora Ayudante Doctor del Área de Fisiología de la Universidad de Zaragoza, y

ENRIQUE MARTÍNEZ BALLARÍN, Profesor Titular del Área de Fisiología de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que D. César Berzosa Sánchez, ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, el siguiente trabajo de investigación titulado: **“Estudio del Daño Oxidativo, Niveles de Defensas Antioxidantes y Efecto Ergogénico de la Melatonina en Pruebas de Esfuerzo Físico Agudo”**. Consideramos que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como Tesis para optar al grado de Doctor Europeo.

Zaragoza, 20 de junio de 2011

Eva M^a Gómez Trullén

Lorena Fuentes Broto

Enrique Martínez Ballarín

Este trabajo se ha financiado gracias a los siguientes proyectos de investigación:



“Fisiología del envejecimiento y del estrés oxidativo” (B 40).
Grupo de Investigación Consolidado del Gobierno de Aragón.



“Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad” (RETICEF) (RD06/0013). Fondo de Investigación Sanitaria. Ministerio de Sanidad y Consumo.

Programa de Apoyo a la Investigación. Solicitud de Infraestructuras. Universidad de Zaragoza. Convocatorias 2.004 (INF2004-BIO-03) y 2007 (INF2007-BIO-05).



“Influencia del ejercicio físico agudo y del entrenamiento en las membranas celulares y mitocondriales. Papel protector de los mecanismos antioxidantes celulares” Convocatorias 2009. Universidad de Zaragoza



“Cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes provocadas por el entrenamiento” Instituto de Estudios Altoaragoneses. Diputación Provincial de Huesca.

AGRADECIMIENTOS

Allá por el año 2005, yo acababa de terminar mi Licenciatura y me decidí a conocer en qué consistía el mundo de la investigación, del que tanto había oído hablar, y nunca había vivido. Comencé mi periodo docente y fue allí donde coincidí con Eva M^ª Gómez, una antigua profesora, que me ofreció la posibilidad de colaborar con ella en un proyecto que comenzaba. Como todos los comienzos fueron duros, sobre todo por las becas que poco a poco me iban negando. Pero como sobre todo tenía ilusión, no me importó y continué mirando hacia adelante en busca de un hueco en el mundo científico y docente, dentro del cual continuó.

Esta Tesis Doctoral ha supuesto para mí un gran reto, tanto en el plano académico como en el profesional y personal. Tengo que agradecer a muchas personas las oportunidades que me han dado y el apoyo que he recibido de ellos. Por eso voy a intentar recordaos a todos:

A la profesora **Eva M^ª Gómez**, por haberme brindado la oportunidad de descubrir, de preguntar y de construir, porque eso es realmente la investigación. A la profesora **Lorena Fuentes**, porque ha pasado de ser una gran compañera a ser una gran directora. Tú me has enseñado (y enseñas) a lo que se puede llegar con entusiasmo y ganas por mejorar. Al profesor **Enrique Martínez** por su disposición a ayudarme siempre que se lo he pedido. Al profesor **José Joaquín García** por darme la oportunidad de unirme a su grupo de investigación. Gracias a todos por enseñarme lo que es la Universidad, de qué sirve el trabajo bien hecho y que eso, al final, pone a cada uno en su sitio. Sin vosotros no estaría presentando este trabajo ahora.

Al profesor **Javier Miana**, además de enseñarme como trabajar dentro de un laboratorio, me has enseñado la interdisciplinariedad y que el trabajo compartido con otros ámbitos también aporta mucho a la investigación científica. Gracias por los ratos que hemos pasado investigando la longevidad de los cabritos, la proliferación/depleción de los garbanzos y muchos más buenos ratos.

Proffessor **Malcolm J. Jackson**, thank you for accepting this young chap in your lab and the chance of learn by myself. There, I learnt how to work in a very big lab and how many people of many countries could accept me as one of them.

A mis compañero de Fisiología: **Carlos, Marcos, Emma, Miguel**, y sobre todo a **Edu**, mi primer “subordinado”. Muchas gracias por todos los ratos que hemos compartido, los buenos y los no tan buenos.

Thanks for all my labmates in Liverpool: **Anna, Claire, Debbie, Lily, Aphro, Dawn, Ash, Alieu, Tabitha, Zoe, Alan** and especially to **Jesús**. I hope you remember me, the half I remember you.

A **Mapi, Goretti, Eva, Carmen, María, Jesús** y todos nuestros compañeros de fatigas con los que tantos concursos gastronómicos diarios hemos ganado.

A todos mis amigos: **Iñaki, Txus, Capi, Vic, Peke, Mel, Chanman, Nestor**, por acompañarme en todos estos “retos” de la vida. Gracias por estar siempre que os he necesitado y por seguir aguantándome. Gracias también a **ELLK**, por la temporada de gloria que hemos vivido.

A ti, **Marta**, porque siempre has sido mi apoyo. Sin ti no habría aguantado tanto. Muchas gracias por seguir a mi lado en los buenos y los malos momentos de este duro camino.

A toda mi familia, a mis padres **Isidro y Conchita**. Gracias a vosotros soy la persona que hoy termina esta Tesis. Muchas gracias por enseñarme todo lo que sé, el compromiso con lo que se empieza, el esfuerzo por conseguirlo y la satisfacción de lograrlo. Nunca os podré agradecer todo lo que me habéis enseñado, vuestro cariño y lo que habéis luchado por mí. A mi hermano **Víctor**, por tu apoyo y por enseñarme otra visión de la vida. Muchas gracias.

A todas aquellas personas y amigos que no he citado y que de alguna forma han contribuido a que esta Tesis haya llegado a buen término.

A todos vosotros, muchas gracias.

A mis padres, amigos y a ti...

“Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro”

René Descartes (1596-1650)

“Life is what happens to you while you're busy making other plans”

John Lennon (1940-1980)

ABREVIATURAS



·NO	Óxido nítrico	IMC	Índice de masa corporal
·O ₂ ⁻	Radical superóxido	iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
·OH	Radical hidroxilo	Lpm	Latidos por minuto
¹ O ₂	Oxígeno singlete	LPO	Lipoperoxidación
4-HDA	4-hidroxialquenos	MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
ABTS	2,2'-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico)	MDA	Malonildialdehído
ADN	Ácido desoxirribonucleico	MWC	Capacidad máxima de trabajo
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial	NA	Noradrenalina
ADP	Adenosin difosfato	NaCl	Cloruro sódico
aMT	Melatonina ó N-(2-(5-metoxiindol-3-il)etil)acetamida	NADH	Nicotinamida adenín-dinucleótido reducida
ANOVA	Análisis de la varianza	NADPH	Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducida
AP-1	Proteína activadora 1	NFκB	Factor nuclear Kappa B
ATP	Adenosin trifosfato	nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
BSA	Albúmina sérica bovina	NO ₂	Dióxido de nitrógeno
CAT	Catalasa	NOS	Óxido nítrico sintasa
COX	Ciclooxygenasa	O ₂	Oxígeno molecular
Cu	Cobre	OMS	Organización Mundial de la Salud
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina	ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
DPH	Difenilhexatrieno (DPH)	p/v	Peso/volumen
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético	PAS	Presión arterial sistólica
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial	PAD	Presión arterial diastólica
EPO	Eritropoyetina	PKC	Proteinquinasa C
ERNs	Especies reactivas dependientes de nitrógeno	PO ₂	Presión parcial de oxígeno
EROs	Especies reactivas dependientes de oxígeno	Q	Gasto cardiaco
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducida	R·	Radical alquilo
FC	Frecuencia cardiaca	RO·	Radical alcoxilo
Fe	Hierro	ROO·	Radical peroxilo
FeCl ₃	Cloruro férrico	ROOH	Peróxido lipídico
FLA ₂	Fosfolipasa A ₂	RS·	Radical de átomos de azufre
GPx	Glutación peroxidasa	Se	Selenio
GR	Glutación reductasa	SOD	Superóxido dismutasa
GSH	Glutación	TAS	Actividad total antioxidante
GSSG	Sulfuro de glutación	TCA	Ácido tricloroacético
H ⁺	Hidrogenión	TRIS	Tris[hidroximetil]aminometano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico
Hb	Hemoglobina	t-BuO ₂ H	t-butilo hidroperóxido
HClO	Ácido hipocloroso	TMA-DPH	1-[4-(trimetilamonio)-fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico	TrxR	Tiorredoxina reductasa
HIOMT	Hidroxiindol-O-metil transferasa	v/v	Volumen/volumen
HO ₂ ·	Radical perhidroxilo	VO _{2max}	Consumo máximo de oxígeno
HONOO	Ácido peroxinitroso	Vs	Volumen sistólico

ÍNDICE



ABSTRACT	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN.....	9
<i>Radicales libres.....</i>	<i>11</i>
Concepto de radical libre.....	11
Tipos de radicales libres	12
Formación de los radicales libres en los seres vivos.....	17
Mecanismos de protección antioxidante.....	22
Concepto de estrés y daño oxidativo.....	33
<i>Ejercicio físico</i>	<i>40</i>
Actividad física y salud	40
Fisiología del ejercicio.....	42
Ejercicio físico, radicales libres y antioxidantes.....	57
<i>Melatonina y Ejercicio físico.....</i>	<i>65</i>
Ejercicio físico y secreción endógena de melatonina.....	65
Ejercicio físico y administración exógena de melatonina.....	66
JUSTIFICACIÓN	73
OBJETIVOS.....	79
MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
<i>Sujetos.....</i>	<i>85</i>
<i>Animales.....</i>	<i>86</i>
<i>Cicloergometrías en sujetos.....</i>	<i>87</i>
<i>Ergometrías en animales.....</i>	<i>88</i>
<i>Obtención y preparación de muestras biológicas.....</i>	<i>89</i>
Extracción de muestras sanguíneas.....	89
Aislamiento de membranas eritrocitarias.....	89
<i>Métodos analíticos</i>	<i>91</i>
Determinación de la concentración de proteínas.....	91
Cuantificación de la peroxidación lipídica.....	93
Cuantificación de restos carbonilo	95
Determinación de la fluidez de membrana	97
Determinación de la actividad total antioxidante plasmática.....	99
Determinación de actividades enzimáticas	100
<i>Métodos estadísticos</i>	<i>103</i>
Estudio descriptivo de los datos.....	103
Inferencia estadística.....	103
RESULTADOS	105
<i>Sujetos.....</i>	<i>107</i>
<i>Estudio de la fluidez de las membranas eritrocitarias e índices plasmáticos de daño oxidativo después de ejercicios físicos agudos en humanos</i>	<i>108</i>
Cambios en la fluidez de las membranas eritrocitarias.....	108
Índices plasmáticos de daño oxidativo.....	110
<i>El ejercicio agudo incrementa la actividad total antioxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes del plasma en hombres no entrenados.....</i>	<i>112</i>

Cambios en la actividad total antioxidante	112
Cambios en las actividades enzimáticas	114
<i>La melatonina como ayuda ergogénica en el ejercicio agudo</i>	118
DISCUSIÓN	121
<i>Estudio de la fluidez de las membranas eritrocitarias e índices plasmáticos de daño oxidativo después de ejercicios físicos agudos en humanos</i>	123
<i>El ejercicio agudo incrementa la actividad total antioxidante y la actividad de las enzimas antioxidantes del plasma en hombres no entrenados</i>	127
<i>La melatonina como ayuda ergogénica en el ejercicio agudo</i>	130
<i>Comentario final</i>	133
CONCLUSIONES.....	135
CONCLUSIONS.....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	143

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla I. Resumen de los principales antioxidantes no enzimáticos.....	32
Tabla II. Volumen sistólico(Vs) de diferentes grupos de personas.....	49
Tabla III. Datos antropométricos como edad, altura, peso e índice de masa corporal (IMC), y parámetros ergométricos como el consumo máximo de oxígeno (VO _{2max}) y la capacidad máxima de trabajo (MWC).	107

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Configuración electrónica de los orbitales moleculares de varias especies reactivas dependientes de oxígeno.	12
Figura 2. Reducción del oxígeno para formar agua.	18
Figura 3. Reacciones principales de la peroxidación lipídica.....	34
Figura 4. Reacciones de los radicales libres con las proteínas.	35
Figura 5. Modelo de mosaico fluido por el que se explica la estructura de las membranas celulares.....	38
Figura 6. Movimientos de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de una membrana celular.....	38
Figura 7. Concepto de salud como estado cambiante dentro de un continuo.	41
Figura 8. Esquema de las fases de consumo de oxígeno durante el ejercicio.....	44
Figura 9. Relación entre gasto cardiaco (Q), volumen sistólico (Vs) y frecuencia cardiaca (FC) en latidos por minuto (lpm).....	47
Figura 10. Efecto del pH (A) y de la temperatura (B) en la curva de saturación de la hemoglobina.	53
Figura 11. Efectos de los radicales libres en la célula.	63
Figura 12. Consentimiento informado firmado por los participantes	85
Figura 13. Realización de una cicloergometría.....	87
Figura 14. Realización de una ergometría en la cámara metabólica	88
Figura 17. Protocolo de aislamiento de membranas de eritrocitos.	90
Figura 18. Protocolo de cuantificación de proteínas.	92
Figura 19. Protocolo de cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenoales (4-HDA).	94

Figura 20. Fundamento de la cuantificación de restos carbonilo en las proteínas.	96
Figura 21. Protocolo de medición de la polarización en las membranas.....	98
Figura 22. Reacciones implicadas en la valoración de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa.....	102
Figura 23. Fluidez de las membranas plasmáticas aisladas de eritrocitos de 34 hombres sanos durante el reposo (A) y tras el ejercicio máximo progresivo (B), continuo (C) y submáximo (70% del máximo) durante 30 minutos (D).	109
Figura 24. Efecto del ejercicio agudo en la carbonilación proteica plasmática en 34 hombres sanos en reposo (A) e inmediatamente después de distintos protocolos de ejercicio (B, C y D).....	110
Figura 25. Concentraciones plasmáticas de malonildialdehido (MDA) y 4-hidroxi-alquenoales (4-HDA) en 34 hombres sanos durante el reposo e inmediatamente post-ejercicios (B, C y D).	111
Figura 26. La actividad total antioxidante en plasma de 34 hombres sanos en reposo (A) e inmediatamente después de realizar un ejercicio máximo progresivo (B), un test mantenido hasta el agotamiento (C) y una prueba submáxima (70% de la carga máxima de trabajo) durante 30 minutos(D).....	113
Figura 27. Actividad de la catalasa (CAT) en plasma de 34 hombres sanos en reposo (A) y justo después de realizar un ejercicio (B, C y D).....	114
Figura 28. Actividad de la glutatión reductasa en el plasma de 34 hombres sanos a nivel basal (A) y después de realizar tres esfuerzos (B, C y D).	115
Figura 29. Actividad de la glutatión peroxidasa en el plasma basal (A) e inmediatamente después de realizar un ejercicio máximo progresivo (B), un test mantenido hasta el agotamiento (C) y una prueba submáxima (70% de la carga máxima de trabajo) durante 30 minutos(D).	116
Figura 30. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en el plasma de 34 hombres sanos durante el reposo (A) y tras dos ejercicios máximos (B y C) y uno submáximo (D).....	117
Figura 31. Duración (A) y distancia total recorrida (B) de las ergometrías realizadas en 10 ratas, 5 de ellas tratadas con melatonina (aMT).	118
Figura 32. . Velocidad final (A) y consumo máximo de oxígeno (VO ₂) (B) alcanzados en las ergometrías realizadas en 10 ratas, 5 de ellas tratadas con melatonina (aMT).	119

ABSTRACT



Regular physical activity prevents diseases and improves our quality of life. Acute exercise induces oxidative stress, but also produces antioxidant defences. Our aim was to determine oxidative damage and antioxidant defences, and evaluate the ergogenic capacity of melatonin in acute exercise.

Both maximal and submaximal exercises, in healthy volunteers, decreased membrane fluidity, quantified by fluorescence spectroscopy, and increased protein carbonilation, which indicates protein damage. At the same time, total antioxidant status and catalase, superoxide-dismutase, glutathione-peroxidase, and glutathione-reductase activities were increased. Melatonin increased distance, speed, time, and maximal oxygen consumption in the animal model of maximal exercise.

In conclusion, free radicals generated during acute exercise provoke an adaptation, increasing antioxidant defences. Moreover, melatonin administration is advantageous for sports performance.

RESUMEN



La actividad física regular previene enfermedades y mejora nuestra calidad de vida. El ejercicio agudo induce estrés oxidativo, aunque también produce defensas antioxidantes. Nuestro objetivo fue cuantificar el daño oxidativo y defensas antioxidantes y evaluar la capacidad ergogénica de la melatonina en ejercicios agudos.

Los ejercicios máximos y submáximos, en los voluntarios sanos, disminuyeron la fluidez de membrana, cuantificada mediante espectroscopía de fluorescencia, y aumentaron la carbonización proteica, marcador de daño a proteínas plasmáticas. Al mismo tiempo se incrementaron la actividad total antioxidante y las actividades de la catalasa, superóxido-dismutasa, glutatión-peroxidasa y glutatión-reductasa. La melatonina incrementó la distancia, la velocidad, el tiempo y el consumo máximo de oxígeno en el modelo animal de ejercicio máximo.

En conclusión, los radicales libres producidos durante ejercicios agudos conducen a una adaptación, aumentando las defensas antioxidantes. Además, la administración de melatonina resulta ventajosa para el rendimiento deportivo.

INTRODUCCIÓN



RADICALES LIBRES

CONCEPTO DE RADICAL LIBRE

Todos los átomos están compuestos por un núcleo, formado por protones y neutrones, y una corteza de electrones que se mueven alrededor del núcleo, dentro de orbitales. Estos son las zonas del espacio donde la posibilidad de encontrar un electrón es mayor. Los electrones tienen distintos niveles energéticos y dependiendo de ellos, se distribuyen en un tipo de orbital u otro. En cada orbital puede haber hasta dos electrones girando sobre su propio eje, lo que genera de esta forma energía magnética que viene determinada por el cuarto número cuántico o de *spin* que puede representarse por $+ \frac{1}{2}$ o por $- \frac{1}{2}$, según el sentido de giro horario o antihorario respectivamente. Si en un orbital se encuentran dos electrones apareados, sus sentidos de giro son opuestos, anulándose de esta manera la energía magnética generada por cada uno de ellos al girar (*spin* $+ \frac{1}{2}$ se anularía con el *spin* $- \frac{1}{2}$), pasando este átomo a llamarse diamagnético. Los electrones tienden a asociarse con otro electrón, de forma que aparean sus sentidos de rotación en un sistema de baja energía.

Un radical libre es aquella especie química, bien sea átomo, molécula o parte de ésta, capaz de una existencia independiente, que posee uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo (Halliwell 1991). El electrón desapareado tiene un momento magnético no compensado que hace que la molécula tenga una carga magnética, llamándose paramagnética. La carga eléctrica de un radical libre puede ser positiva, negativa o neutra. Los electrones tienden a estar apareados en su orbital, debido a que esta es la configuración energética más estable, por ello el radical libre tiende a recuperar la estabilidad cediendo un electrón, agente reductor, o captando un electrón, agente oxidante. De esta forma el radical libre se estabiliza, pero a expensas de desestabilizar la molécula a la que ha donado o a la que ha sustraído un electrón, ya que esta molécula deja de tener sus electrones apareados, convirtiéndose pues en un radical libre (Halliwell 1993). La vida media de los radicales libres es muy corta y depende del tiempo que tardan en reaccionar con otro átomo o molécula para conseguir captar o ceder su electrón desapareado y así compensar el *spin* de su orbital más externo.

TIPOS DE RADICALES LIBRES

Existen una cantidad enorme de radicales libres, tanto derivados del oxígeno como del nitrógeno, del carbono o del azufre.

1. ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO

Se denominan especies reactivas dependientes del oxígeno (EROs), tanto a los radicales libres relacionados con el oxígeno como a sus moléculas precursoras y a los derivados de estos. Algunas son verdaderos radicales libres, como el radical hidroxilo. Otras simplemente son fuente de radicales libres, como el peróxido de hidrógeno, pero no son radicales libres ya que tienen sus electrones apareados.

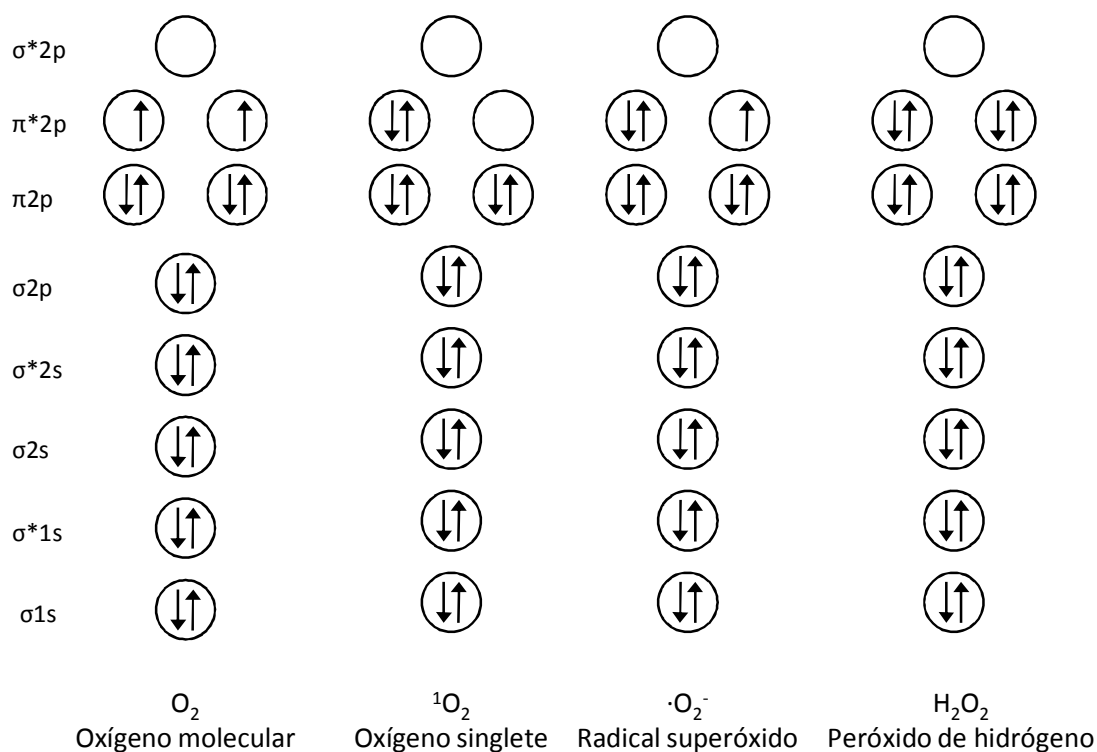


Figura 1. Configuración electrónica de los orbitales moleculares de varias especies reactivas dependientes de oxígeno.

1.1. OXÍGENO MOLECULAR

En la naturaleza, el oxígeno como tal aparece en forma molecular o diatómica (O₂). El oxígeno diatómico contiene 16 electrones, distribuidos en orbitales moleculares. El oxígeno molecular es un radical libre ya que posee dos electrones desapareados en sus orbitales más externos (Figura 1). Ambos electrones tienen el mismo sentido de rotación, por lo que son

electrones desapareados con el mismo *spin*. El oxígeno sólo interactuará con radicales cuyos electrones tengan *spines* complementarios a los del oxígeno, lo que se denomina “restricción de *spin*”. Por ello, el O₂ es un birradical de muy baja reactividad.

1.2. OXÍGENO SINGLETE

La molécula de oxígeno puede presentarse con otras configuraciones electrónicas en sus últimos orbitales. Si los dos electrones de estos orbitales se configuran con *spines* opuestos (Figura 1) se forma una molécula llamada oxígeno singlete (¹O₂). El ¹O₂ no es un radical libre aunque debido a que es una forma excitada reacciona fácilmente con otras moléculas.

El ¹O₂ se produce por absorción de energía electromagnética a partir del oxígeno molecular. Esta energía hace que uno de los electrones del último orbital cambie el sentido de su *spin*. La absorción de grandes cantidades de energía por el oxígeno para generar ¹O₂ se encuentra restringida a sucesos fotoquímicos (Sik, Paschall y cols. 1983; Zigler y Goosey 1981). También puede formarse en reacciones de oxidación de diversas especies o durante reacciones enzimáticas. Puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles la energía de su excitación o combinándose con ellas. El ¹O₂ tiene la capacidad de sustraer un hidrogenión (H⁺) de un ácido graso insaturado, comenzando de este modo la reacción de peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge 1990)

1.3. RADICAL SUPERÓXIDO

El radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) procede de la reducción de una molécula de O₂. Se produce en todas las células eucariotas animales, sobre todo en la mitocondria y el retículo endoplasmático (Fridovich 1978; Nohl y Hegner 1978).

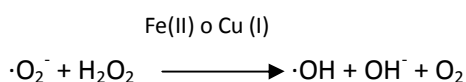
En la cadena respiratoria en estado 4, un estado controlado y altamente reducido en la mitocondria, entre el 1 y el 2 % de los electrones transportados da lugar a $\cdot\text{O}_2^-$ (Boveris, Oshino y cols. 1972). También se forma este radical al producirse el estallido respiratorio de las células fagocíticas y como producto de muchas reacciones enzimáticas, como las que implican a la xantina oxidasa o al citocromo P450 a nivel del retículo endoplasmático. También se forma por la autooxidación de otras moléculas, como las xantinas, catecolaminas, compuestos tiólicos, flavinas y hemoproteínas en presencia de cantidades traza de metales (Valko, Morris y cols. 2005).

El radical superóxido producido en la mitocondria puede lesionar los transportadores de la cadena respiratoria mitocondrial y el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (Sohal y Brunk 1992). Aunque el $\cdot\text{O}_2^-$ no es muy tóxico, es la principal fuente de formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), capaz de atravesar membranas y, a su vez, es un precursor del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), la especie reactiva de mayor toxicidad (Halliwell 1991). También el $\cdot\text{O}_2^-$ puede reaccionar con el radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), y formar el anión peroxinitrito (ONOO^-) (Brzeszczynska y Gwozdziński 2008).

1.4. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El H_2O_2 no es un radical libre como tal, ya que no posee electrones desapareados en su último orbital (Figura 1), pero se le considera una especie reactiva ya que es precursor de otros radicales libres. Es la forma menos reactiva de las EROs, pero su importancia recae en su capacidad para atravesar membranas biológicas. Debido a esto, puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción participando en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de radicales libres.

El H_2O_2 no es tóxico en concentraciones fisiológicas, pero se puede convertir en $\cdot\text{OH}$ mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Fenton 1894; Haber y Weiss 1934). El hierro (Fe) y el cobre (Cu) son metales de transición muy comunes. El daño producido por estas reacciones dependerá pues de la disponibilidad y localización de estos metales.



1.5. RADICAL HIDROXILO

El $\cdot\text{OH}$ es el radical libre más reactivo y, por ello, dañino que existe, con una vida media de un nanosegundo. No tiene gran poder de difusión porque reacciona con toda macromolécula vecina, ya sean ácidos nucleicos (Anson, Mason y cols. 2006; Sastre, Pallardo y cols. 2000), proteínas (Yu 1994) o lípidos (Halliwell y Gutteridge 1990). Además no se conoce ninguna enzima que lo detoxifique directamente, posiblemente porque el propio radical la destruiría.

En el ser vivo se puede producir por varios mecanismos:

1. Fisión homolítica del agua. Aunque es poco frecuente, puede formarse a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos γ).

2. Ruptura fotolítica del H_2O_2 , la luz UV no tiene suficiente energía como para dividir una molécula de agua, pero puede escindir una molécula de H_2O_2 en dos moléculas de radical hidroxilo.
3. Reacciones de Fenton – Haber – Weiss (Fenton 1894; Haber y Weiss 1934), en la que una molécula de H_2O_2 reacciona con una molécula de $\cdot O_2^-$, u otro agente reductor, para producir un $\cdot OH$, un OH^- y O_2 , aunque la velocidad de esta reacción es demasiado baja para ser de importancia fisiológica, los metales de transición, como el Cu o el Fe pueden actuar como cofactores de la misma, acelerando la velocidad de reacción (Gutteridge y Halliwell 1989).

1.6. RADICAL PERHIDROXILO

El radical perhidroxilo ($HO_2\cdot$) se genera a partir de $\cdot O_2^-$. Es un radical libre muy liposoluble, resultando un potente inductor de la peroxidación lipídica en membranas biológicas (Kanner, German y cols. 1987).

1.7. RADICALES ALCOXILO Y PEROXILO

Los radicales alcoxilo ($RO\cdot$) y peroxilo ($ROO\cdot$) son especies generadas durante la peroxidación lipídica, por el ataque de algunos radicales libres sobre las cadenas carbonadas de los ácidos grasos de las colas de los fosfolípidos que forman las membranas celulares (Kanner, German y cols. 1987). No son tan reactivos como el radical $\cdot OH$, pero son parte importantísima en el inicio y propagación de la peroxidación lipídica por toda la membrana celular (Kanner, German y cols. 1987).

2. ESPECIES REACTIVAS DEPENDIENTES DEL NITRÓGENO

Las especies reactivas dependientes del nitrógeno (ERNs) engloban a los radicales libres dependientes del nitrógeno y a las especies que generan dichos radicales.

2.1. ÓXIDO NÍTRICO

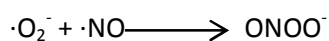
El $\cdot NO$ es un gas hidrófilo y liposoluble, con una vida media de 3-5 segundos. Se produce endógenamente en diversos tipos de células, catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).

El $\cdot\text{NO}$ tiene como funciones regular el flujo sanguíneo local, antiagregante plaquetario, neuromodulador, segundo mensajero y mediador del neurotransmisor excitador glutamato (Moncada y Higgs 1995). Posee una acción antiinflamatoria importante, pero a la vez promueve la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio (Grisham, Jourdain y cols. 1999). Otro efecto del $\cdot\text{NO}$ reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo hemo. El óxido nítrico puede reaccionar con los ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, y ocasionar necrosis.

Se suele considerar al óxido nítrico como una “espada de doble filo”, ya que un exceso de $\cdot\text{NO}$ es citotóxico. Este $\cdot\text{NO}$ es poco reactivo y no puede nitrar proteínas definitivamente, pero puede reaccionar con otros compuestos intermedios que pueden ver alterada su función. Un ejemplo es la reacción entre $\cdot\text{NO}$ y el $\cdot\text{O}_2^-$ donde se forma ONOO^- , que es un potente oxidante responsable de gran parte de la toxicidad causada por el $\cdot\text{NO}$ (Beckman y Ames 1998; Halliwell y Gutteridge 2007).

2.2. ANIÓN PEROXINITRITO

El ONOO^- se forma *in vivo* debido a la reacción del $\cdot\text{NO}$ y el $\cdot\text{O}_2^-$ (Miles, Bohle y cols. 1996; Pietraforte y Minetti 1997; Radi, Beckman y cols. 1991).



Aunque esta reacción puede ser una forma de eliminación de $\cdot\text{O}_2^-$ sin la consiguiente formación de H_2O_2 , el ONOO^- puede protonarse formando ácido peroxinitroso (HONOO) y este a su vez, se descompone con facilidad en $\cdot\text{OH}$ y dióxido de nitrógeno (NO_2), que son muy tóxicos (Janssen, Van Houten y cols. 1993; Lipton, Choi y cols. 1993).

El ONOO^- también es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos aromáticos en proteínas, degradar carbohidratos, nitrar y oxidar guanosina, y fragmentar ADN (Beckman y Koppenol 1996; Beckmann, Ye y cols. 1994). Otra de las posibles interacciones es con CO_2 , muy abundante sobre todo durante el ejercicio, en la mitocondria. La molécula resultante, ONOOCO_2^- , se descompone a su vez en el radical carbonato ($\cdot\text{CO}_3^-$) y en $\cdot\text{NO}_2$ (Ducrocq, Blanchard y cols. 1999; Hardeland 2009; Hardeland, Poeggeler y cols. 2003; Squadrito y Pryor 1998). Todas estas acciones convierten al ONOO^- en una molécula con efectos devastadores en la función celular.

2.3. DIÓXIDO DE NITRÓGENO

El dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) es un radical libre contaminante producido a partir de la oxidación del $\cdot\text{NO}$ atmosférico (Postlethwait, Langford y cols. 1995). Es uno de los compuestos que inician la cadena de la peroxidación lipídica (Halliwell 1994).

3. RADICALES DE ÁTOMOS DERIVADOS DEL CARBONO

Los radicales libres centrados en un átomo de carbono ($\text{R}\cdot$) surgen del ataque de un radical oxidante sobre una molécula biológica. En el primer paso se arranca un átomo de hidrógeno de un grupo metileno situado entre enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un $\text{ROO}\cdot$. A su vez, estos radicales pueden participar en otras reacciones que generan otras especies radicales (Frei 1994).

4. RADICALES DE ÁTOMOS DERIVADOS DEL AZUFRE

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre ($\text{RS}\cdot$) formado, por ejemplo, a partir de una cisteína. Ésta se autooxida con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiilo e hidroxilo (Sparrow y Olszewski 1993).

FORMACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES EN LOS SERES VIVOS

1. FUENTES ENDÓGENAS DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres pueden originarse tanto de manera exógena como de manera endógena (Frei 1994). La primera de las fuentes endógenas es la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

1.1. CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIAL

La mayoría los organismos aerobios, durante la respiración mitocondrial, utilizan el oxígeno como aceptor de electrones. Esta reacción se utiliza para acumular energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). En la mitocondria se produce la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico, que producen la forma reducida de la nicotinamida adenín-dinucleótido (NADH) y la de flavín adenín-dinucleótido (FADH_2). Estas moléculas transfieren electrones a la cadena respiratoria, un sistema formado por complejos enzimáticos que catalizan una cadena de reacciones redox acopladas, utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones, con el

fin de generar una energía suficiente para convertir el adenosín difosfato (ADP) en ATP. En la respiración mitocondrial es inevitable la formación de subproductos a partir del oxígeno. Estos son los radicales libres (Yu 1994). Este hecho es conocido como la “paradoja del oxígeno”, ya que el mismo oxígeno imprescindible para la vida de los organismos aerobios, puede quitársela. La mitocondria es una fuente importante de EROs, entre las que se encuentran las siguientes: $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , $\cdot\text{NO}$ y ONOO^- .

Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción genera tres compuestos intermedios “parcialmente reducidos” entre este y el agua. El primero es el $\cdot\text{O}_2^-$, que resulta de la reducción con un electrón del oxígeno molecular. El segundo es el H_2O_2 , resultante del aporte de otro electrón y dos protones. El tercero es el $\cdot\text{OH}$, como resultado final de la suma de un tercer electrón y un protón. La reducción completa finaliza con el cuarto electrón y otro protón para generar una molécula de agua (Figura 2).

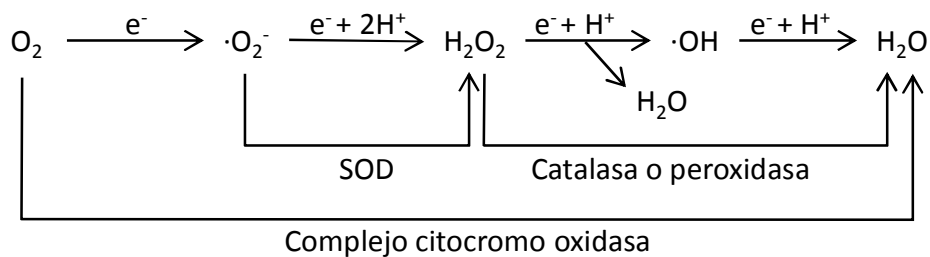


Figura 2. Reducción del oxígeno para formar agua.

SOD: Superóxido dismutasa

La cadena de transporte electrónico mitocondrial está formada por complejos situados en la membrana interna mitocondrial que se denominan del I al IV, aunque la enzima ATP-sintasa es denominada a veces, complejo V. Hay elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, que tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O_2 , como los complejos I y III, y es durante esta cesión cuando pueden generarse los $\cdot\text{O}_2^-$ al recibir el oxígeno un único electrón. Por tanto, es en estos complejos principalmente donde se producen los radicales libres (Cross y Jones 1991). Cuando todo el ADP ha sido transformado en ATP, se produce un estado controlado y altamente reducido en la mitocondria, llamado estado 4. En este estado entre el 2% y el 5% de los electrones transportados no llegan al complejo IV, liberándose $\cdot\text{O}_2^-$. En el estado más activo y oxidado, el estadio 3, la producción de radicales libres es mínima, en torno al 0,1% (Boveris, Oshino y cols. 1972; Cadenas, Boveris y cols. 1977; Frei 1994; St-Pierre, Buckingham y cols. 2002).

Así pues, se produce $\cdot\text{O}_2^-$, que a través de la reacción catalizada por la superóxido dismutasa genera H_2O_2 , capaz de atravesar las membranas y alcanzar el citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris, Oshino y cols. 1972).

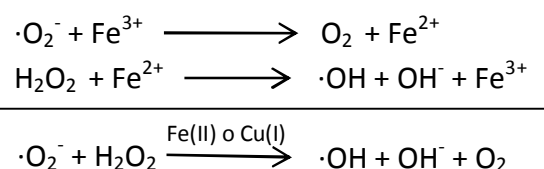
1.2. CITOCROMO P450

El citocromo P450 es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias hasta mamíferos, de las que se han identificado más de 2000 isoformas distintas, cada una con especificidad de sustrato diferente. En los seres humanos, se encuentran ampliamente distribuidos por todo el organismo, especialmente en las células del hígado y del intestino, principalmente en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias. Salvo excepciones, el citocromo P450 cataliza reacciones de monooxigenación que requieren oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato, mientras que el otro es reducido a agua. Juega un papel muy importante en el metabolismo de tóxicos y/o fármacos, catalizando reacciones que faciliten su metabolismo y excreción (Hodgson 2004).

Sin embargo, se ha propuesto la formación de $\cdot\text{O}_2^-$ por el citocromo P450, cuando se produce la reducción directa del oxígeno molecular liberando superóxido (Goepfert, Scheerens y cols. 1995; Koop 1992).

1.3. REACCIONES DE FENTON Y HABER – WEISS

El H_2O_2 es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición, principalmente el hierro y en menor medida cobre u otros iones, pueden reaccionar con ellos por medio de una reacción de oxidorreducción: las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. En estas el $\cdot\text{O}_2^-$ reduce el metal y este al peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación de $\cdot\text{OH}$ y anión hidroxilo. En este proceso el metal actúa únicamente como catalizador del mismo.



La necesidad de la presencia de metales de transición en la reacción de Fenton convierte al hierro y al cobre (los más abundantes en sistemas biológicos) en agentes esenciales como catalizadores del daño oxidativo. El Fe (II) se oxida a Fe (III) con mucha

facilidad siendo este muy insoluble. Además los procesos de captación y distribución del hierro y de los iones metálicos en general, están muy bien regulados en los mamíferos, ya que tienen una gran cantidad de proteínas de unión a metales: ferritina, transferrina, ceruloplasmina, etc. que actúan como reserva de iones metálicos impidiendo además que estos participen en reacciones redox, siempre que se de una situación no reductora (Halliwell 1991). El hierro libre en los sistemas biológicos está en cantidades muy pequeñas y en forma férrica, para evitar que reaccione. El verdadero papel del $\cdot\text{O}_2^-$ en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss es el de actuar como reductor del hierro.

1.4. OXIDASAS

Las oxidasas más conocidas son las NADPH oxidasas y la xantina oxidasa. Las primeras se encuentran principalmente en la membrana plasmática de los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) junto con la mieloperoxidasa. Al encontrarse con un agente infeccioso, los fagocitos sufren un aumento muy grande de su consumo de oxígeno llamado “estallido respiratorio”. Este consumo ocurre principalmente en la membrana plasmática donde se encuentra el complejo NADPH oxidasa. Este utiliza NADPH como donante de electrones y como aceptor final de estos el O_2 , cuya reducción conlleva la formación de $\cdot\text{O}_2^-$ (Moldovan y Moldovan 2004). El $\cdot\text{O}_2^-$ puede ser reducido por la SOD, hasta H_2O_2 , el cual es un precursor para la generación de $\cdot\text{OH}$, como hemos visto antes. La mieloperoxidasa incrementa notablemente la actividad microbicida del H_2O_2 dado que en presencia de cloruro, se oxida para formar ácido hipocloroso (HClO).

El $\cdot\text{OH}$ y HClO son formados por la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa en los fagocitos activados como mecanismo frente a microorganismos (Babior 1978). Sin embargo, esta función defensiva tiene un efecto negativo. Estos radicales pueden atacar y dañar los tejidos sanos circundantes, lo que está implicado en algunas enfermedades con base inmunológica como la artritis reumatoide (Babior 1978; Moslen 1994).

La xantina oxidasa aparece derivada de la conversión de la xantina deshidrogenasa en situaciones de hipoxia, isquemia u otras situaciones de déficit energético. La xantina deshidrogenasa es una enzima que participa en el metabolismo de las purinas, oxidando la hipoxantina a xantina y esta a ácido úrico, utilizando el NAD^+ como aceptor de electrones (Kinnula, Crapo y cols. 1995). En su forma oxidasa, esta enzima emplea el O_2 como aceptor de electrones, lo que produce radicales libres (Radi, Tan y cols. 1992). En hipoxia, la hipoxantina se va acumulando sin poder ser oxidada hasta que se produce la reoxigenación. Entonces la

xantina oxidasa cataliza la oxidación de hipoxantina formando grandes cantidades de $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 (Granger, Rutili y cols. 1981; Saugstad 1990).

1.5. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

Son una familia de isoenzimas denominadas NOS que catalizan la formación de óxido nítrico. Existen tres isoenzimas distintas: la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS) se expresan constitutivamente y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio (Bredt, Glatt y cols. 1991; Lamas, Marsden y cols. 1992); la inducible (iNOS) la expresan los macrófagos cuando son estimulados por citoquinas, lipopolisacáridos u otros antígenos, siendo su expresión regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, en la que participan factores de transcripción sensibles al estado redox como el factor nuclear κB (NF- κB) o las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Bosca, Zeini y cols. 2005; Lowenstein y Snyder 1992; MacMicking, Xie y cols. 1997; Moncada y Higgs 1991; Yui, Hattori y cols. 1991).

1.6. BETA-OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los microsomas, también denominados peroxisomas, realizan la metabolización o β – oxidación de ácidos grasos con una longitud de cadena de 24 o más átomos de carbono, así como la de fenoles, formaldehidos y alcoholes, requiriendo la presencia de O_2 y generando grandes cantidades de H_2O_2 (Beckman y Ames 1998; Boveris, Oshino y cols. 1972).

1.7. OTRAS ENZIMAS

La lipooxigenasa y la ciclooxigenasa son enzimas asociadas a la membrana plasmática que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generando radicales libres durante su catálisis (Frei 1994).

2. FUENTES EXÓGENAS DE RADICALES LIBRES

Muchos agentes antineoplásicos, tales como la adriamicina y la bleomicina, y también algunos antibióticos son fuentes de radicales libres. Algunos de los efectos de estos fármacos se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$. También pueden generar radicales libres las radiaciones (rayos X o γ) o radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) y los factores ambientales, como contaminantes aéreos, la hiperoxia, los pesticidas, humos del tabaco, solventes, anestésicos o hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o contienen en sí mismos radicales libres (como el humo del tabaco), o se convierten en ellos debido a su metabolismo en el que actúan enzimas

como las monooxigenasas (citocromo P450 o flavín monooxigenasa por ejemplo), diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas), la epóxido hidrolasa, etc. (Halliwell y Gutteridge 2007; Philpot 1991).

MECANISMOS DE PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE

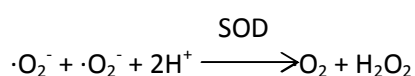
La atmósfera de nuestro planeta fue anaerobia hasta la aparición del oxígeno hace unos 2.500 millones de años, como resultado de la rotura del agua en el proceso fotosintético de unas cianobacterias. El oxígeno molecular, vital para la existencia de organismos aerobios, es inherentemente tóxico dada su capacidad de formación de radicales libres. Para sobrevivir en este ambiente aerobio poco favorable, los organismos desarrollaron una serie de mecanismos de defensa antioxidante. La célula posee además la capacidad de sintetizar sistemas reparadores/eliminadores de las proteínas, lípidos y ADN dañados.

En 1995 Halliwell definió los antioxidantes como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell, Aeschbach y cols. 1995). Los antioxidantes pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros son proteínas de peso molecular elevado, que minimizan el daño oxidativo catalizando reacciones químicas. Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas pequeñas que reaccionan directamente con los radicales libres, evitando que ejerzan su acción tóxica sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las principales características de varias moléculas antioxidantes presentes en el ser vivo en condiciones fisiológicas se explican a continuación.

1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

1.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima presente prácticamente en todos los mecanismos aerobios. Fue caracterizada por McCord y Fridovich en 1969 y cataliza la dismutación de $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 (McCord y Fridovich 1969).



Pueden encontrarse en el cuerpo humano tres isoformas de SOD, cada una ubicada preferentemente en un tejido específico, y caracterizada por el metal que contienen. La Cu/Zn

SOD se encuentra en la célula, concretamente en el núcleo, citosol y lisosomas, mientras que en otra organela celular, la mitocondria, se encuentra la Mn SOD. Existe una tercera SOD, la extracelular, que se localiza exclusivamente en los fluidos extracelulares, como el plasma, que protege del radical superóxido generado fuera de la célula (Fridovich 1995).

Los niveles más altos de SOD se encuentran en el hígado, la corteza suprarrenal, riñón y bazo. Su actividad se regula mediante su síntesis, siendo además sensible a la oxigenación de los tejidos y a la generación de radicales libres (Harris 1992).

La importancia biológica de la SOD se demostró con bacterias y levaduras mutantes carentes de SOD. Estos microorganismos fueron mucho más sensibles al daño oxidativo, y cuando se les reintrodujo el gen que regula su expresión, se volvieron resistentes a dicho daño (Gregory y Fridovich 1973). Hay numerosos trabajos que demuestran la importancia de esta enzima como antioxidante (Fattman, Schaefer y cols. 2003; Fukai, Folz y cols. 2002; Kinnula y Crapo 2003; McCord 2002).

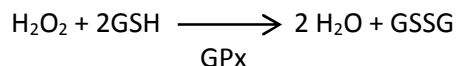
1.2. CATALASA

La enzima catalasa (CAT), también llamada hemoperoxidasa, cataliza la reacción de depuración de H_2O_2 en O_2 y agua y reduce hidroperóxidos de metilo y etilo. Se encuentra en todas las células de los mamíferos, incluidos los eritrocitos, aunque principalmente está localizada en los peroxisomas de las células del hígado y el riñón. Al encontrarse también en el citosol depura el H_2O_2 que proviene de la mitocondria generado por acción de la enzima SOD (Bai y Cederbaum 2001; Chance, Sies y cols. 1979).

Es una de las enzimas más eficientes conocidas, tanto que no puede saturarse por H_2O_2 incluso a concentraciones elevadas. La CAT comparte su función de eliminación de H_2O_2 con la glutatión peroxidasa, aunque con diferentes afinidades ya que en presencia de pequeñas cantidades de H_2O_2 la glutatión peroxidasa cataliza preferentemente la reacción con peróxidos orgánicos (Ray y Husain 2002).

1.3. GLUTATIÓN PEROXIDASA

La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima intracelular selenio-dependiente (Flohe, Gunzler y cols. 1973), localizada principalmente en el citosol y la matriz mitocondrial, que cataliza la reducción de H_2O_2 y otros hidroperóxidos a agua utilizando como donante de electrones un tripéptido, el glutatión (GSH), siguiendo la siguiente reacción:

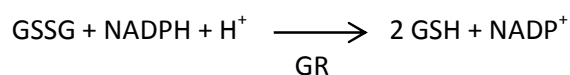


En esta reacción se genera sulfuro de glutatión (GSSG), formado por dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro. Esta enzima tiene un papel importante a nivel de los hematíes ya que protege a la hemoglobina de la ruptura por el ataque de radicales libres (Mills 1957).

Se han descrito cuatro isoenzimas de GPx en humanos. Aunque su expresión es ubicua, la actividad de cada isoforma varía dependiendo del tejido. La GPx citosólica o mitocondrial, GPx1, reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el H_2O_2 a expensas del glutatión. La GPx4 se localiza tanto en la fracción citosólica como en la membrana y puede reducir los hidroperóxidos de los fosfolípidos, peróxidos de ácidos grasos e hidroperóxidos de colesterol, que se producen en las membranas y lipoproteínas oxidadas. La GPx1 se localiza principalmente en eritrocitos, riñón e hígado, y la GPx4 se expresa en células del epitelio renal y en testículo. La GPx2 y la GPx3 extracelulares se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y el riñón, respectivamente (Brown y Arthur 2001).

1.4. GLUTATIÓN REDUCTASA

La enzima glutatión reductasa (GR) tiene un papel fundamental en la transformación del glutatión en su forma oxidada o disulfuro de glutatión (GSSG), que es muy tóxico para la célula, a la forma reducida de este tripéptido (GSH) siguiendo la siguiente reacción (Hopkins y Elliott 1931).



De la función del GSH en estado reducido hablaremos más adelante, ya que se le considera un antioxidante no enzimático.

1.5. TIORREDOXINA REDUCTASA

La tiorredoxina reductasa (TrxR) es una selenoenzima que contiene dos sitios activos en sus grupos cisteína, uno de los cuales contiene selenio (Se), el cual es esencial para sus actividades enzimáticas (Mustacich y Powis 2000). Se ha demostrado que la actividad enzimática de la TrxR está muy disminuida en células humanas con deficiencia de Se (Marrucci, Flohe y cols. 1997). Esta enzima forma parte del sistema de la tiorredoxina, catalizando la reducción de la tiorredoxina oxidada, utilizando como donante de electrones el NADPH.

Cataliza además otras reacciones como la reducción de hidroperóxidos lipídicos y H_2O_2 (Nordberg y Arner 2001). Se conocen 3 isoformas: TrxR1, localizada principalmente en el núcleo y el citosol, la TrxR2 que se encuentra en la mitocondria y la SpTrxR expresada en espermatozoides. Todas ellas conservan el residuo selenocisteína (Arner y Holmgren 2000; Nordberg y Arner 2001).

2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

En la Tabla I se resumen los principales antioxidantes no enzimáticos.

2.1. GLUTATIÓN

El glutatión reducido (GSH) es el tripéptido γ -glutamil-cisteinil-glicina. Es el tiol más abundante dentro de los de bajo peso molecular. Se encuentra presente en prácticamente todas las células de mamíferos en concentraciones elevadas, entre 0,5 y 10 mM. La característica que le permite mantener a los grupos sulfhidrilo de las proteínas en su forma reducida y al hierro del grupo hemo en su forma ferrosa (Fe^{2+}) es su grupo sulfhidrilo (con el que al oxidarse forma un puente de hidrógeno) y su enlace γ -glutamil, que le hace resistente al ataque de las peptidasas. Por estas características se considera que es un regulador redox y que tiene una función protectora contra el daño oxidativo dentro de la célula (Meister 1992).

Como agente reductor, el GSH juega un papel importante en muchos procesos de detoxificación, aunque su papel principal como antioxidante sea reducir a otros antioxidantes, después de su interacción con radicales libres. También interacciona directamente con H_2O_2 , $\cdot O_2^-$ y $\cdot OH$ (Martensson y Meister 1991; Meister 1994).

Hay estudios en los que animales con deficiencia de este tripéptido sufren patologías relacionadas con los radicales libres como la formación de cataratas (Martensson, Jain y cols. 1991; Martensson, Steinherz y cols. 1989), o la degeneración del cuerpo multilaminar de las células pulmonares (Jain, Martensson y cols. 1992).

2.2. VITAMINA E

La vitamina E es un antioxidante ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose tanto en los reinos animal como vegetal. Bajo el nombre de Vitamina E se engloban al menos ocho isómeros del tocoferol, entre los que destaca el α -tocoferol por su actividad antioxidante. Este isómero se distribuye principalmente en la glándula suprarrenal, corazón, testículo e hígado (Burton, Joyce y cols. 1982).

Debido a su alta liposolubilidad, los tocoferoles son los principales antioxidantes en la región hidrofóbica de las membranas biológicas. Por el contrario, no tienen actividad en medios acuosos como el plasma sanguíneo, el citosol celular, el interior del núcleo o la matriz mitocondrial. La vitamina E depura $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, $\text{NO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ (Burton, Joyce y cols. 1982; Escames, Guerrero y cols. 1997; Halliwell y Gutteridge 2007; Ohki, Takamura y cols. 1984; Siu, Reiter y cols. 1998; Siu, Reiter y cols. 1999). Además de reaccionar con estos radicales, detiene la peroxidación lipídica y quela metales como el hierro (Zimmer, Thrish y cols. 1993), que como hemos visto ya, producen el radical $\cdot\text{OH}$ por las reacciones de Fenton-Haber-Weiss.

2.3. VITAMINA C

La vitamina C o ácido ascórbico es una molécula hidrosoluble que ejerce su actividad antioxidante en medio acuoso. Se localiza tanto en fluidos intra como extracelulares (Diliberto, Daniels y cols. 1991; Niki 1991). El efecto de la vitamina C *in vitro* está ampliamente demostrado, siendo capaz de depurar los radicales $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, $\text{NO}\cdot$, H_2O_2 , formando el radical semidehidroascorbato (Chen, Sensini y cols. 2000; Ghosh, Mukhopadhyay y cols. 1997; Meister 1992; Mendiratta, Qu y cols. 1998; Niki 1991; Zhang y Omaye 2000). Otro papel fundamental en su función antioxidante es que contribuye a la regeneración de la vitamina E oxidada por su interacción con los radicales libres, lo que supone un sistema antioxidante completo en zonas acuosas y lipídicas (May, Qu y cols. 1998). Se ha demostrado que individuos con carencia de esta vitamina y síntomas de escorbuto tienen una elevación de 8-hidroxideoxiguanosina, una base mutada que indica daño oxidativo al ADN (Halliwell y Gutteridge 2007).

Sin embargo, cuando hay concentraciones elevadas de vitamina C, esta actúa como prooxidante, especialmente en presencia de metales de transición como el hierro, ya que esta vitamina reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} y este favorece la reacción de Fenton-Haber-Weiss generando $\cdot\text{OH}$ (Buettner y Jurkiewicz 1996; Fukuzawa, Chida y cols. 1981; Gerster 1999; Sahu y Washington 1991; Sahu y Washington 1992; Samuni, Aronovitch y cols. 1983).

2.4. VITAMINA A

La vitamina A o retinol es una molécula presente en vegetales y frutas derivada del β -caroteno con una gran capacidad para atrapar los radicales libres. Es una molécula que principalmente actúa en las membranas lipídicas y que tiene una destacada capacidad para depurar $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$ y $\text{ROO}\cdot$ (Biesalski, Hemmes y cols. 1996; Regnault, Postaire y cols. 1993; Rousseau, Davison y cols. 1992; Telfer, Dhimi y cols. 1994). Pero, al igual que sucede con el

ácido ascórbico, el β -caroteno puede actuar como antioxidante y como prooxidante. Con presiones parciales de oxígeno bajas se ha observado que actúa como antioxidante, mientras que con presiones parciales superiores a 150 mm Hg. tiene efectos prooxidantes (Burton y Ingold 1984).

2.5. ÁCIDO ÚRICO

El ácido úrico es uno de los productos finales del metabolismo de las purinas en el ser humano. Se llega a él a partir de la degradación de las bases adenina y guanina, hasta llegar a xantina y, mediante la acción de la enzima xantina oxidasa, a ácido úrico. La capacidad del ácido úrico para depurar $\cdot\text{OH}$ fue descrito por primera vez en 1960 por Howell y Wyngaarden (Howell y Wyngaarden 1960). Aunque el mecanismo de esta acción antioxidante no está exactamente definido, se ha propuesto que actúa formando complejos con metales de transición como Fe y Cu (Davies, Sevanian y cols. 1986). Se ha establecido una correlación entre los niveles plasmáticos de ácido úrico y la protección antioxidante en los sistemas circulatorio y respiratorio (Becker, Reinholz y cols. 1989; Nieto, Iribarren y cols. 2000; Peden, Hohman y cols. 1990).

2.6. TIORREDOXINA

La tiorredoxina es una proteína que se encuentra ampliamente distribuida en la célula y facilita la reducción de otras proteínas, como el glutatión, mediante un intercambio tiol – disulfuro. Es una proteína pequeña, de unos 12 kDa. La principal diferencia con el glutatión, es que esta proteína contiene dos residuos cisteína susceptibles de ser oxidados/reducidos de manera reversible. Al oxidarse estos forman un enlace disulfuro, que puede ser reducido por la enzima TrxR de nuevo. Su principal función es la de proveer de equivalentes reductores a otras enzimas, como la ribonucleótido reductasa que está implicada en la replicación de ADN (Holmgren 1989) o la tiorredoxina peroxidasa, que cataliza la transformación del H_2O_2 a agua, aunque también actúa como factor de crecimiento celular y como inhibidor de la apoptosis (Mustacich y Powis 2000).

2.7. MELATONINA

La melatonina (5-metoxi-N-acetil-triptamina) es una molécula ubicua en la naturaleza, presente en organismos unicelulares, plantas y animales desde hace al menos dos mil millones de años (Macías, Rodríguez-Cabezas y cols. 1999; Poeggeler y Hardeland 1994). Desde el punto de vista filogenético ha estado ligada a la protección antioxidante frente a las radiaciones

ionizantes y a una atmósfera muy rica en oxígeno. Para ello, la función de la melatonina era ralentizar las funciones celulares durante las horas de mayor exposición a dichas radiaciones durante el día, para activarlas durante las horas de oscuridad durante las cuales existía un menor riesgo. Por ello, desde un punto de vista filogenético, la melatonina cumplía una doble función de control de los ciclos circadianos, así como de molécula antioxidante. Posiblemente esta dualidad es la que ha hecho que la melatonina no sólo se encuentre en la glándula pineal, desde donde pasa al líquido cefalorraquídeo y a la circulación cerebral y sistémica, sino que sus concentraciones sean mucho mayores (en miligramos y no en picogramos) en otros órganos como la retina, las células inmunes, el intestino, la bilis, en donde ejerce una función puramente antioxidante frente al estrés oxidativo sufrido en estos órganos (Reiter, Tan y cols. 2003).

La melatonina se forma a partir del triptófano y fue la primera indolamina en ser descubierta y aislada (Lerner, Case y cols. 1960). En la glándula pineal, su producción está regulada por la presencia de estímulos lumínicos, que actúan sobre la actividad de enzimas como la N acetiltransferasa, implicada en la síntesis de melatonina a partir de la serotonina. Hay otras enzimas relacionadas con la síntesis que están inhibidas durante el día por la noradrenalina segregada por fibras nerviosas simpáticas (Atkinson, Drust y cols. 2003). Cuando no hay luz, se produce un aumento de la producción y secreción de esta hormona, que entre otras acciones regula los ritmos biológicos, tanto de sueño-vigilia, como de temperatura (Reiter 1993). Además presenta un efecto regulador de la inmunidad (Guerrero y Reiter 2002). En la actualidad su papel antiinflamatorio está bien demostrado (Escames, Acuna-Castroviejo y cols. 2006; Mayo, Sainz y cols. 2005), donde los efectos antioxidantes, mediante la disminución del NO, y los efectos mitocondriales, atenúan la señal proinflamatoria (Hardeland 2008).

La melatonina es una molécula bastante liposoluble debido a su estructura indólica, por lo que atraviesa fácilmente la bicapa de las membranas por difusión. Esto determina que el estímulo de la síntesis de melatonina eleve rápidamente sus niveles en plasma y en todos los compartimientos del organismo (Reiter 1991). Una vez en la sangre, la melatonina es transportada en parte unida a la albúmina (70%) y en parte en forma libre (30%), disuelta en el plasma (Illnerova, Vanecek y cols. 1979; Vakkuri, Leppaluoto y cols. 1985). De cualquier forma los niveles plasmáticos de melatonina están condicionados por la duración del ciclo luz/oscuridad, con concentraciones altas durante la noche (Pang, Yu y cols. 1980; Reiter 1991). Incluso la señal de melatonina es capaz de reflejar los cambios estacionales. Podríamos decir que en verano se producen niveles bajos de melatonina debido a la mayor duración del día, y en invierno concentraciones mayores, pero de menor amplitud (Arendt, Symons y cols. 1981).

Tras considerar a la melatonina como una hormona, se intentaron explicar sus funciones, principalmente las relacionadas con el control de los biorritmos y la reproducción, a través de su interacción con receptores de membrana. Sin embargo, estudios posteriores han descrito funciones de la melatonina que eran independientes de receptores de membrana. Así, en primer lugar, se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Reiter, Tan y cols. 1994; Tan, Poeggeler y cols. 1993); en segundo lugar, se caracterizaron receptores nucleares para la melatonina en órganos fuera del SNC (Acuña-Castroviejo, Pablos y cols. 1993; Becker-Andre, Wiesenberg y cols. 1994; Hirose, Smith y cols. 1994) y en SNC (Acuña-Castroviejo, Pablos y cols. 1993; Giguere, Tini y cols. 1994); por último, se demostró la capacidad de la melatonina para unirse a algunas proteínas intracelulares, como la proteína quinasa C (PKC) (Anton-Tay, Ramirez y cols. 1998), la calmodulina (Huerto-Delgado, Anton-Tay y cols. 1994; Pozo, Reiter y cols. 1997) y la calreticulina (Macias, Escames y cols. 2003).

Los resultados obtenidos en estos estudios sobre la interacción de la melatonina con la calmodulina, la calreticulina y la PKC, respaldan la idea de que la melatonina puede contribuir a modular la estructura del citoesqueleto. Además, como las tres proteínas son dependientes de Ca^{2+} , es posible que otras proteínas con dominios de unión al calcio también puedan estar influenciadas por la melatonina. Los efectos de la melatonina en estos procesos de fosforilación/desfosforilación pueden ser el mecanismo por el que esta indolamina module numerosas respuestas biológicas. Además, otro lugar de unión de la melatonina parece encontrarse en la mitocondria, en la zona anfipática del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Hardeland 2008).

La melatonina a pesar de ser capaz de atravesar todas las membranas biológicas no se libera en grandes cantidades al torrente circulatorio, sino que permanece en los tejidos a mayor concentración que en el plasma (Hardeland 2008). El hecho de que se acumule en algunos tejidos provoca la ausencia de ritmo circadiano de melatonina en éstos. Esto puede explicar el pico nocturno de melatonina. Este debería tener efectos protectores tanto de día como de noche, a pesar de que la mayor producción de radicales libres sea durante las fases de mayor actividad motora. Al carecer los órganos de ritmos de melatonina, sólo la generación de radicales libres influye en la fase de detoxificación en estos tejidos (Hardeland 2005; Hardeland, Coto-Montes y cols. 2003).

Entre las funciones antioxidantes de la melatonina, destacan la capacidad para depurar gran cantidad de algunas especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, como $\cdot OH$ (Acuña-Castroviejo, Martín y cols. 2001; Reiter, Tan y cols. 2003), $\cdot O_2^-$, H_2O_2 (Tan, Manchester y cols.

2000; Tan, Manchester y cols. 2000), HClO (Dellegar, Murphy y cols. 1999; Marshall, Reiter y cols. 1996), NO[•] (Reiter, Tan y cols. 2003) y ONOO⁻ (Zhang, Squadrito y cols. 1999).

Además de la capacidad propia para depurar radicales libres, la melatonina es capaz de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción del estrés oxidativo (Antolin, Mayo y cols. 2002; Kotler, Rodriguez y cols. 1998; Mayo, Sainz y cols. 2002). En primer lugar, estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y de la GR, regulando así el balance GSSG/GSH (Barlow-Walden, Reiter y cols. 1995; Martín, Macías y cols. 2000; Pablos, Agapito y cols. 1995; Pablos, Reiter y cols. 1998). Además, aumenta la producción de glutatión y estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que es la encargada de generar el NADPH, requerido por la GR (Pierrefiche y Laborit 1995). Así, la melatonina estimula otras enzimas antioxidantes como la SOD (Antolin, Rodriguez y cols. 1996) y la CAT (Acuña-Castroviejo, Martín y cols. 2001; Coto-Montes y Hardeland 1999; León, Acuña-Castroviejo y cols. 2004; Reiter, Tan y cols. 2003). También inhibe otras enzimas que generan radicales libres, como la NOS (Pozo, Reiter y cols. 1994; Pozo, Reiter y cols. 1997) y ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Reiter, Tan y cols. 2003).

Dado que la melatonina es tanto lipofílica (Reiter 1991) como hidrofílica (Shida, Castrucci y cols. 1994), puede realizar sus funciones antioxidantes con igual eficiencia en múltiples compartimentos subcelulares, es decir, en el núcleo (Blickenstaff, Brandstadter y cols. 1994; Tan, Poeggeler y cols. 1993; Vijayalaxmi, Reiter y cols. 1995), en el citosol (Abe, Reiter y cols. 1994) y en las membranas (Giusti, Gusella y cols. 1995; Melchiorri, Reiter y cols. 1995; Pierrefiche, Topall y cols. 1993).

Recientemente se ha descrito que la melatonina puede realizar sus funciones antioxidantes a nivel mitocondrial. Estos estudios tienen especial interés porque la mitocondria es la primera fuente de radicales libres en las células eucariotas (Yu, Suescun y cols. 1992) y además porque la melatonina es capaz de atravesar fácilmente la membrana mitocondrial y acumularse a elevadas concentraciones en dicha organela (Acuña-Castroviejo, Escames y cols. 2003; Acuña-Castroviejo, Martín y cols. 2001; León, Acuña-Castroviejo y cols. 2004; Martín, Macías y cols. 2000). Entre las principales acciones de la melatonina sobre la fisiología mitocondrial cabe incluir las siguientes:

1. La administración crónica de melatonina incrementa el número de mitocondrias de las células (Decker y Quay 1982).

2. Estabiliza la membrana mitocondrial, tanto interna (García, Reiter y cols. 1999) como externa frente a EROs (Karbownik, Reiter y cols. 2000).
3. Incrementa la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias hepáticas y cerebrales (Acuña-Castroviejo, Escames y cols. 2005; Acuña-Castroviejo, Martín y cols. 2001; Martín, Macías y cols. 2000).
4. Previene la formación de radicales libres por la mitocondria (Hardeland 2008).
5. Aumenta la producción de ATP mitocondrial (Martín, Macías y cols. 2002).

Algunas de las propiedades antioxidantes de la melatonina son debidas a su efecto genómico en la regulación de la expresión de proteínas y la actividad de enzimas antioxidantes (Antolin, Rodriguez y cols. 1996), así como la inhibición de la expresión de enzimas prooxidantes/proinflamatorias como la iNOS y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Crespo, Macias y cols. 1999; Escames, Leon y cols. 2003; Gilad, Cuzzocrea y cols. 1997; Mayo, Sainz y cols. 2005). La melatonina, además es un agente neuroinmunomodulador e inhibe la translocación del factor nuclear NF- κ B en el interior del núcleo (Chuang, Mohan y cols. 1996).

2.8. OTROS ANTIOXIDANTES

Muchas otras moléculas también tienen propiedades antioxidantes. De entre ellas destacan la glucosa, la N-acetilcisteína, la bilirrubina, los estrógenos, los quelantes que se unen a metales de transición como la transferrina, la ferritina, la hemosiderina, la ceruloplasmina, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la desferroxamina. Las principales características de estas moléculas se resumen en la Tabla I.

Tabla I. Resumen de los principales antioxidantes no enzimáticos.

GPx: Glutación peroxidasa, GSH: Glutación, AP-1: Proteína activadora 1, NfκB: Factor nuclear Kappa B

Antioxidantes no enzimáticos		
Antioxidante	Localización	Acción
Glutación	Intracelular, alveolos	Sustrato de la GPx, reacciona con $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ y radicales libres orgánicos, regenera la vitamina C
Vitamina E	Membranas lipídicas y lipoproteínas plasmáticas	Depura $\cdot^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}$ y $\text{RO}\cdot$, detiene la peroxidación lipídica y quela hierro
Vitamina C	Fluidos intra- y extracelulares	Depura $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ y $\cdot\text{NO}$ formando radical semidehidroascorbato y contribuye a la regeneración de la vitamina E. Actúa como prooxidante cuando reduce Fe^{3+} a Fe^{2+} y éste cataliza la reacción de Fenton-Haber-Weiss generando $\cdot\text{OH}$.
Vitamina A	Membranas lipídicas	Depura $\cdot\text{O}_2^-$, $\text{ROO}\cdot$ y $^1\text{O}_2$
Ácido úrico	Amplia distribución	Depura $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, HClO y $\text{ROO}\cdot$, quela metales de transición.
Tiorredoxina	Fluidos intra- y extracelulares	Sustrato de peroxiredoxinas, que reducen peróxidos. Regenera GSH y vitamina C. Regula mediante reducción – oxidación factores de transcripción, como el AP-1 o el NF-κB.
Quelantes: transferrina, ceruloplasmina, ferritina, hemosiderina, EDTA, desferroxamina		Quelan metales de transición.
Bilirrubina	Sangre, tejidos	Antioxidante que rompe reacciones en cadena, reacciona con $\text{ROO}\cdot$ y $^1\text{O}_2$
Coenzima Q	Cadena de transporte electrónico mitocondrial	Protege frente a la peroxidación lipídica, regenera vitamina E
Flavonoides	Exógenos	Reaccionan con $\text{ROO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$ y el $\cdot\text{O}_2^-$, formando el radical fenoxi
Glucosa	Amplia distribución	Depura $\cdot\text{OH}$
Cisteína	Amplia distribución	Reduce compuestos orgánicos donando electrones del sulfhidrilo
Melatonina	Citosol, núcleo, mitocondria, membranas, plasma	Potente antioxidante. Depura $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$, HClO , ONOO^- . Activa enzimas antioxidantes e inhibe enzimas productoras de radicales libres

CONCEPTO DE ESTRÉS Y DAÑO OXIDATIVO

La generación de radicales libres está relativamente equilibrada con los sistemas de defensa antioxidante en organismos sanos. Pero cuando se rompe el equilibrio a favor de la formación de radicales libres, se genera lo que se denomina estrés oxidativo. Este se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies y Mehlhorn 1986). Así pues, puede originarse por un exceso de elementos prooxidantes (exposición a radiación ionizante, radiación UV intensa, toxinas, estrés psicológico o físico, y ciertas patologías), por un déficit de agentes antioxidantes (sistemas enzimáticos deficientes en recién nacidos, envejecimiento,...), o por ambos factores a la vez. La acción de los radicales libres sobre los constituyentes estructurales celulares produce una agresión interna continuada, que amenaza a la integridad de todas las biomoléculas. Las consecuencias patológicas dependerán entonces del tipo de constituyente celular que se vea más dañado.

1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los lípidos, el componente más numeroso de las membranas biológicas, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres, especialmente aquellos que poseen mayor número de dobles enlaces en su molécula, es decir, los ácidos grasos poliinsaturados (Cheeseman y Slater 1993; Gutteridge 1995). Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, el ozono, $\text{RO}\cdot$ y $\text{ROO}\cdot$ (Halliwell 1990; Kanner, German y cols. 1987). El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica (LPO).

La reacción de la LPO comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, y se extrae un átomo de hidrógeno. Esta reacción se produce principalmente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un $\text{ROO}\cdot$ y otras moléculas como endoperóxidos, hidroperóxidos y cicloperóxidos (Curtis, Gilfor y cols. 1984). El nuevo $\text{ROO}\cdot$ formado es capaz, a su vez, de extraer un átomo de hidrógeno de un fosfolípido adyacente, formando un radical alquilo ($\text{R}'\cdot$) y un peróxido lipídico (ROOH), propagando así una reacción en cadena que se extiende por toda la membrana (Hunt, Simpson y cols. 1988; Kanner, German y cols. 1987). La reacción sólo termina cuando los radicales libres interaccionan con moléculas antioxidantes o bien mediante la fragmentación de los ácidos grasos en gran número de productos hasta que se agota el sustrato, lo que implica la muerte

celular. De forma esquemática, la reacción de la peroxidación lipídica se divide en cuatro pasos: iniciación, propagación, ramificación y terminación (Figura 3).

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados produce la formación de uniones cruzadas entre fosfolípidos o entre fosfolípidos y proteínas (Bruch y Thayer 1983; Curtis, Gilfor y cols. 1984). Estas alteraciones estructurales son las principales responsables de la rigidez en las membranas biológicas cuando éstas son expuestas a radicales libres, y por lo tanto determina su pérdida funcional (Bruch y Thayer 1983; Chen y Yu 1994; Dobretsov, Borschevskaya y cols. 1977; Garzetti, Tranquilli y cols. 1993; Schroeder 1984).

Entre los productos formados destacan el malonildialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos (4-HDA), cuantificados en este trabajo como indicadores del grado de LPO. Los productos generados durante la LPO pueden ser también moléculas muy tóxicas capaces de provocar graves alteraciones en la membrana como modificaciones en las proteínas que la integran (Esterbauer, Schaur y cols. 1991; Refsgaard, Tsai y cols. 2000; Subramaniam, Roediger y cols. 1997; Zarkovic 2003) e incluso la ruptura de la membrana (Halliwell 1990).

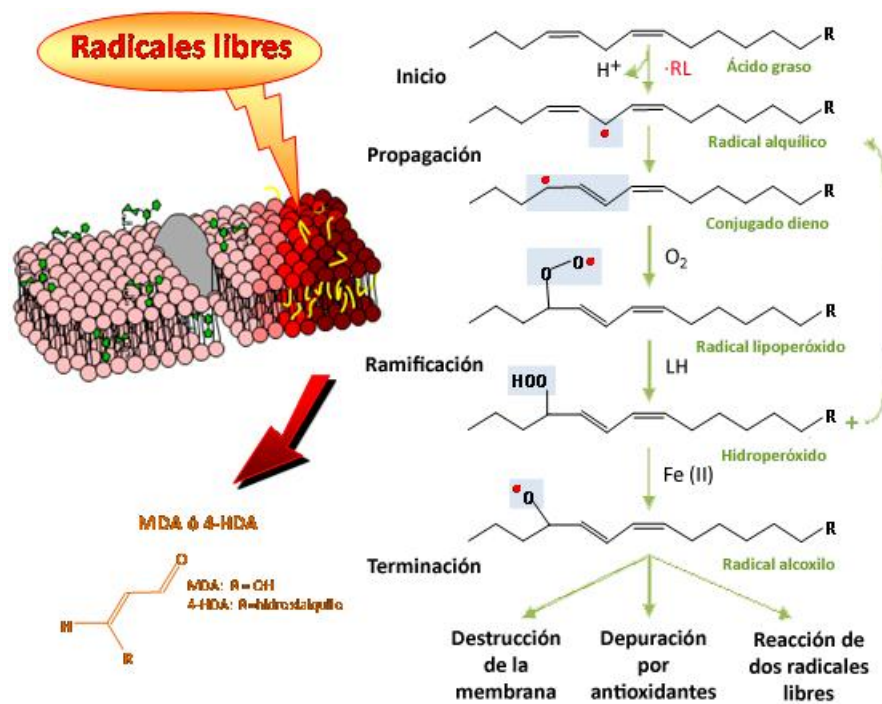


Figura 3. Reacciones principales de la peroxidación lipídica.

·RL: Radical libre, LH: lípido intacto, MDA: malonildialdehído, 4-HDA: 4-hidroxiálquenos.

2. DAÑO OXIDATIVO A LAS PROTEÍNAS

Las proteínas constituyen aproximadamente un 68% del peso seco de las células (Davies 2003), por lo que son un blanco importante para los radicales libres. Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles, sobre todo a nivel del grupo carbonilo, de sufrir daño oxidativo. Esta oxidación puede dar lugar a una alteración de la estructura primaria y un cambio conformacional de la proteína y por tanto, una modificación o pérdida de su función. Dentro de los aminoácidos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que presentan mayor predisposición a ser oxidados (Davies y Goldberg 1987).

Las alteraciones bioquímicas que producen los radicales libres en las proteínas incluyen oxidaciones de las cadenas laterales, fragmentación de la cadena peptídica, formación de enlaces cruzados entre proteínas, modificación de los puentes disulfuro y los enlaces no covalentes como los de hidrógeno, cambios de conformación, alteración de la hidrofobicidad, y adquisición de otros grupos reactivos como por ejemplo la 3,4-dihidroxifenilalanina, los hidroperóxidos y los carbonilos (Davies y Goldberg 1987; Davies 2003; Dean, Fu y cols. 1997; Stadtman 2001). Un caso a destacar es cuando el H_2O_2 y las formas reducidas del hierro y cobre, interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo radicales libres que oxidan inmediatamente a los residuos de aminoácidos vecinos. En muchas enzimas este sitio de unión de metales puede ser el centro activo, por lo que el ataque de radicales libres anularía su funcionalidad (Stadtman 1993).

Aunque la reacción de las proteínas con los radicales libres no se puede considerar como una reacción en cadena en sentido clásico, también se producen una serie de reacciones sucesivas (Figura 4) (Headlam y Davies 2003):

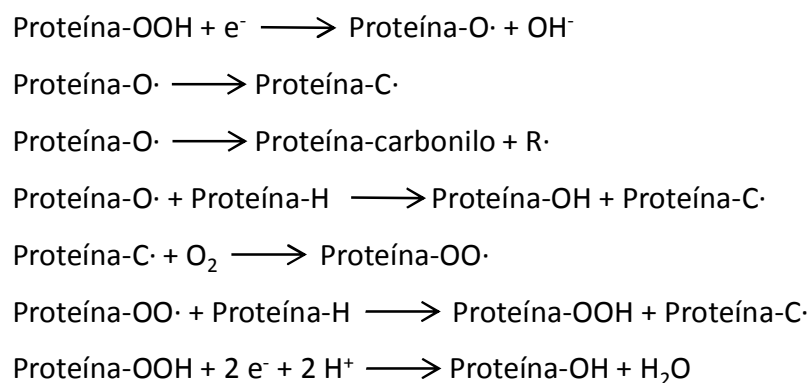


Figura 4. Reacciones de los radicales libres con las proteínas.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como la lisina, prolina y arginina, se oxidan dando grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman, Starke-Reed y cols. 1992). En este trabajo se ha cuantificado la aparición de estos restos como indicador bioquímico de la oxidación de las proteínas.

3. DAÑO OXIDATIVO AL ADN

El ADN también es susceptible de daño oxidativo. El oxígeno es capaz de sumarse a las bases o a los glúcidos del ADN. Cuando un radical libre ataca a una desoxirribosa del ADN, generalmente se produce una ruptura de la cadena a nivel del lugar de reacción. Sin embargo, la cadena complementaria que permanece intacta, puede mantener juntos los dos extremos de la cadena dañada hasta que actúen las enzimas reparadoras. De este modo, este tipo de daño no es usualmente crítico para la célula salvo que la rotura se encuentre cercana en las dos cadenas (Breen y Murphy 1995). La adición de los radicales libres a las bases del ADN es más habitual que la ruptura de las cadenas y da lugar a una gran variedad de productos derivados, siendo el más importante la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina. También se pueden formar puentes cruzados ADN-proteína. La cantidad del nucleósido 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina en órganos o en orina se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN *in vivo* (Fraga, Shigenaga y cols. 1990).

Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Breen y Murphy 1995; Halliwell 1991). Así pues, las lesiones oxidativas al ADN y la mutagénesis son causas importantes del cáncer (Ames, Shigenaga y cols. 1993). Al menos en el caso del ADN nuclear se cree que el hierro juega de nuevo un papel importante en el daño oxidativo. Si el H₂O₂ llega al núcleo, reacciona con el hierro ferroso, generando ·OH que ataca en ese mismo lugar al azúcar o a la base, produciendo roturas de hebra y modificaciones en las bases (Imlay, Chin y cols. 1988).

El daño oxidativo al ADN mitocondrial (ADNmt) es unas 15 veces superior al del ADN nuclear (Richter, Park y cols. 1988). La mitocondria es la principal fuente de radicales libres en reposo, que actuarían sobre los lípidos de membrana mitocondrial, las proteínas de sus sistemas enzimáticos y, fundamentalmente, sobre el ADNmt. Este ADNmt es muy susceptible al daño oxidativo debido a que, al contrario del ADN nuclear, carece de los mecanismos de

reparación adecuados y no tiene la protección que suponen las histonas y poliaminas (Schapira y Cooper 1992). Esto ha llevado a pensar que el daño oxidativo sobre estructuras mitocondriales juega un papel determinante en los procesos de envejecimiento, es la llamada “teoría mitocondrial del envejecimiento”, inicialmente propuesta por Harman en 1972 y desarrollada por Miquel en 1980 (Harman 1972; Miquel, Economos y cols. 1980).

4. DAÑO OXIDATIVO A LOS GLÚCIDOS

Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa, la manosa y el manitol son depuradores del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas, actuando como agentes protectores celulares (Albertini, Rindi y cols. 1996). El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Monboisse y Borel 1992) dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo radical superóxido, provoca su fragmentación lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Greenwald y Moy 1980; Grootveld, Henderson y cols. 1991).

5. EFECTO DE LOS RADICALES LIBRES EN LAS MEMBRANAS CELULARES

Las membranas de las células eucariotas no son estructuras fijas y estáticas sino que por el contrario se caracterizan por ser plásticas y elásticas de unos 5 nm. de espesor, formadas básicamente por una doble capa de lípidos, entre los que se intercalan proteínas que atraviesan total o parcialmente la bicapa. Entre los lípidos destacan los fosfolípidos fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, aunque también hay una concentración importante de esteroides, principalmente colesterol. Las membranas también contienen pequeñas cantidades de glúcidos que se encuentran formando parte de glucoproteínas y glucolípidos (Figura 5). La proporción exacta de todas estas moléculas varía según el tipo de membrana celular y guarda una estrecha relación con su función.

La disposición espacial de los lípidos y las proteínas en las membranas celulares fue descrita por Singer y Nicolson (1972) como el modelo de mosaico fluido. Según éste los fosfolípidos se sitúan formando una bicapa, con los restos acilo o colas hidrófobas de los fosfolípidos situados en la parte central, y las cabezas polares hidrófilas orientadas hacia los medios acuosos intra y extracelulares. Finalmente, las proteínas están incrustadas entre los

lípidos a intervalos irregulares y se mantienen gracias a interacciones entre los lípidos y los dominios hidrofóbicos de las proteínas.

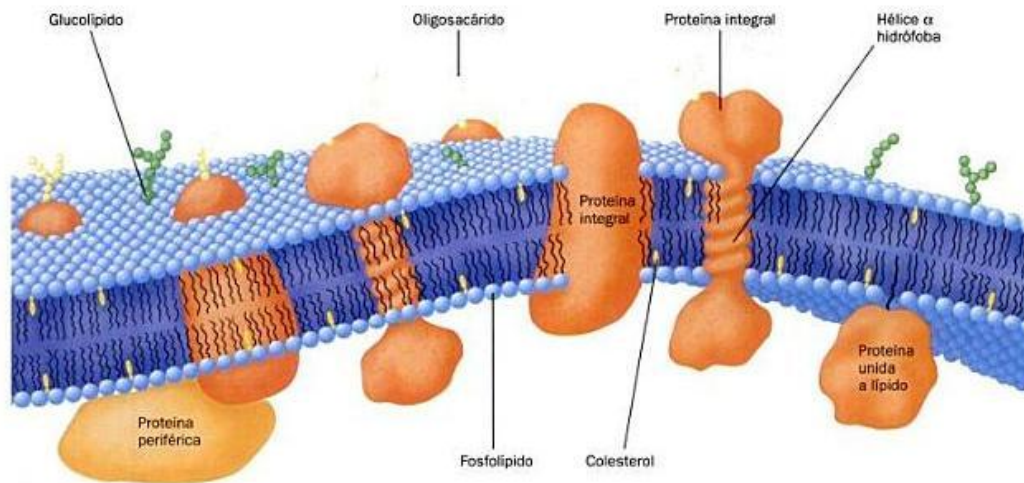


Figura 5. Modelo de mosaico fluido por el que se explica la estructura de las membranas celulares.
Adaptada de Voet (2007)

Los lípidos y proteínas de la membrana forman un mosaico fluido debido a que las uniones entre lípidos y de ellos con las proteínas son enlaces débiles o no covalentes. Esto permite el movimiento de las moléculas divididos en 4 tipos (Figura 6):

- Difusión, en la que los fosfolípidos se mueven lateralmente en el plano de la membrana.
- Rotación, en él estos rotan sobre su eje vertical.
- Flexión y extensión de las colas hidrófobas
- Flip – flop, en el que se produce un salto de una hemicapa a la otra.

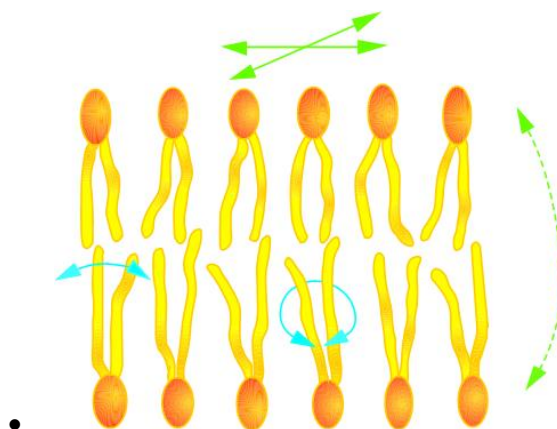


Figura 6. Movimientos de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de una membrana celular.
Las flechas verdes indican los que implican un desplazamiento neto de la molécula y las azules indican los que no implican desplazamiento neto

La composición de la bicapa lipídica y la disposición de las proteínas son asimétricas. Esto significa que en una membrana celular se establecen dominios lipídicos y proteicos diferentes en ambas caras de la membrana, lo que determina que en una misma membrana coexistan distintos grados de fluidez. Las actividades biológicas específicas de las membranas se modulan por sus propiedades físicas. Su flexibilidad les permite adaptarse a los cambios que acompañan el movimiento, el crecimiento y la división celular (Lehninger, Nelson y cols. 2001).

Es un hecho aceptado que las membranas biológicas requieren un estado fluido para desarrollar sus funciones correctamente. Por ello, conocer la estructura y las propiedades físicas de la bicapa constituyen la base para explicar multitud de procesos fisiológicos relacionados directa o indirectamente con la membrana. El transporte de iones y nutrientes, los procesos de transducción de señales que utilizan receptores localizados en la membrana, la acción de enzimas como ATPasas, adenilato ciclasa, la aglutinación plaquetaria, la fagocitosis, algunas funciones relacionadas con la inmunidad, son buenos ejemplos de actividades celulares moduladas por el comportamiento físico de los lípidos de la membrana (Cooper y Hamilton 1977; Dumas, Muller y cols. 1997; Fischkoff y Vanderkooi 1975; Heron, Shinitzky y cols. 1980; Houslay 1985; Levi, Baird y cols. 1990; Shinitzky 1984; Slater, Kelly y cols. 1994; Stubbs y Smith 1984; Sunshine y McNamee 1994; Tomita-Yamaguchi, Rubio y cols. 1991; Viani, Cervato y cols. 1991; Vlastic, Medow y cols. 1993).

Debido a la composición de las membranas celulares, estas son muy susceptibles de ser atacadas por los radicales libres. El principal efecto que tienen estos es el de comenzar la LPO, que como hemos visto antes, afecta a los fosfolípidos alterando su composición y estructura, sobre todo si estos son poliinsaturados, dada la cantidad de dobles enlaces que estos poseen (Gutteridge 1995; Rice-Evans y Burdon 1993). Así, debemos tener en cuenta que si la relación entre ácidos poliinsaturados/saturados disminuye, lo hace también la fluidez de la membrana. Además de esto, la interacción de los lípidos con los radicales libres produce enlaces cruzados entre lípidos y lípidos – proteínas, los cuales también afectan a la membrana aumentando su rigidez (Chen y Yu 1994). Este cambio en su fluidez afecta a todas las funciones antes descritas.

EJERCICIO FÍSICO

ACTIVIDAD FÍSICA Y SALUD

Desde sus orígenes, el ser humano, ha necesitado la actividad física para sobrevivir. Ya en el Paleolítico sus actividades principales eran la caza y la recolección, que conllevaban una gran actividad física. Con el paso del tiempo, el hombre fue desarrollando formas de vida menos duras, en las que no era necesario utilizar su propia energía para sobrevivir, dejando la actividad física progresivamente a un lado, pasando esta a ser algo dedicado a la guerra o al divertimento. Este proceso se vio acelerado enormemente a finales del S. XVIII y principios del S. XIX con la llegada de la revolución industrial. Comienza una época que permite el desarrollo económico pero conlleva un descenso en la práctica física. Gracias a los avances producidos desde entonces, hemos llegado a tener una sociedad con unas condiciones de vida y trabajo que la hacen más fácil y cómoda, pero también más sedentaria. Este progreso ha supuesto una serie de ventajas sociales, que han alargado la esperanza de vida y por otro lado han introducido nuevos factores de riesgo derivados del sedentarismo.

Actualmente, la actividad física está más asociada a la infancia y a la adolescencia. Conforme vamos llegando a la edad adulta asumimos unas responsabilidades laborales, a la vez que nos acomodamos a las ventajas que se nos ofrecen, lo que nos impide realizar ejercicio físico de manera regular. Esta poca actividad física se asocia a ciertos factores de riesgo para la salud, principalmente a nivel cardiovascular (American College of Sports, Roitman y cols. 2001).

El concepto clásico de salud, que considera la salud como la ausencia de enfermedad, ha ido evolucionando a lo largo del tiempo hacia una visión más global de la persona. Así, en 1946, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la salud como el estado completo de bienestar físico, mental y social. Supuso un gran avance en la concepción que se tenía de la salud ya que se mide por primera vez en términos positivos y contempla a la persona en su integridad, pero era un concepto utópico, amplio y subjetivo. Poco a poco fue desarrollándose hasta llegar al concepto actual en el que se considera un estado cambiante dentro del continuo que va desde el estado de bienestar completo hasta la muerte (Figura 7). El objetivo que se pretende es estar lo más cerca posible del bienestar completo, considerando los aspectos físicos, psíquicos y sociales de la persona.



Figura 7. Concepto de salud como estado cambiante dentro de un continuo.

Entre los determinantes de la salud hay una serie de factores fundamentales, tanto intrínsecos como extrínsecos, para conservarla y evitar enfermedades. Cabe destacar los siguientes:

- La edad y los factores hereditarios. No pueden ser modificados, pero pueden tenerse en cuenta en la prevención de enfermedades.
- El medio ambiente. Un ambiente libre de elementos patógenos, tanto biológicos, físicos (radiación, ruido), químicos (metales pesados, sustancias tóxicas) u otros (violencia, estrés) ayuda a aumentar nuestro nivel de salud.
- La existencia de un sistema sanitario capaz de actuar a nivel de salud pública, tanto para prevenir como para tratar enfermedades.
- La adquisición de hábitos de vida saludables. Como por ejemplo la práctica regular de ejercicio físico, llevar una alimentación sana, o evitar conductas de riesgo como fumar y beber en exceso, pautas de descanso regulares, etc. (Pate y Macera 1994).

En cuanto al estilo de vida de las personas, Mendoza lo define como “el conjunto de patrones de conducta que caracterizan la manera general de vivir de un individuo o grupo” (Mendoza, Sagrera Pérez y cols. 1994). Por tanto la salud depende del estilo de vida de las personas, lo que a su vez determina la calidad de vida (Coreil, Bryant y cols. 2001).

En definitiva, realizar una actividad física adecuada y continuada dentro de nuestro estilo de vida, es un elemento fundamental para mantener el mayor nivel de salud posible y elevar nuestra calidad de vida.

FISIOLOGÍA DEL EJERCICIO

Hay pocas situaciones fisiológicas que se aproximen al estrés que sufre el cuerpo humano durante el ejercicio físico intenso, donde se produce una situación de aumento de ritmos cardíaco y respiratorio, presión arterial, temperatura, etc. que en otras situaciones consideraríamos como patológicas. Además de los cambios que podemos observar a simple vista, se producen otros de los que poco a poco se va descubriendo más. Estos cambios van desde el aumento de la perfusión sanguínea en los territorios activos hasta cambios en los factores de transcripción en las células.

1. CLASIFICACIÓN DE LOS EJERCICIOS

Podemos clasificar al ejercicio físico según criterios diferentes (García Morales 2007):

Según la masa muscular utilizada:

- Local: ejercicio donde interviene menos de 1/3 de la masa muscular total.
- Regional: Si participa entre 1/3 y la mitad de la masa muscular total.
- Global: Si interviene más de la mitad de la masa muscular.

Según el tipo de contracción muscular:

- Isotónica: la contracción constante del músculo produce una variación de la longitud de este. Se divide en concéntrica (los extremos del músculo se acercan) y excéntrica (los extremos del músculo se alejan durante la contracción.)
- Isométrica: la contracción no produce variación en la longitud muscular.
- Isocinética: la velocidad de contracción es constante. Para ello la tensión muscular varía a lo largo del recorrido.

Según criterios de potencia (trabajo realizado/tiempo):

- Ejercicios de resistencia: baja potencia, es decir, el mismo trabajo en más tiempo, lo que permite que sean ejercicios que se prolongan en el tiempo. Son ejercicios como la carrera continua o la bicicleta.
- Ejercicios de fuerza: potencia media. El objetivo es mover la máxima carga posible. Son ejercicios como el levantamiento de peso, o saltos.

- Ejercicios de velocidad: potencia alta. El objetivo es recorrer la distancia en el menor tiempo o lanzar un objeto lo más lejos posible.

Según criterios metabólicos:

- METs utilizados: siendo 1 MET un equivalente metabólico o el consumo de O₂ (mL/min) por kg de masa corporal en reposo.
- Consumo de oxígeno (VO₂): se calcula la intensidad del ejercicio en función del consumo de oxígeno que provoca.
- Frecuencia cardiaca (FC): latidos por minuto necesarios durante el ejercicio.
- Vía metabólica de obtención de energía: la energía necesaria para la contracción muscular se obtiene del ATP, al igual que para el resto de las funciones celulares. Pero para obtener ese ATP son necesarias unas reacciones que varían en función del sustrato utilizado. En un primer momento se clasifican según la necesidad de O₂ o no, siendo llamadas vías aeróbicas o anaeróbicas.

Según el nivel de agotamiento:

- Si un ejercicio se lleva hasta el agotamiento, se lo considera máximo.
- Si por el contrario no alcanza el agotamiento, es un ejercicio submáximo.

Según la continuidad del ejercicio:

- Un ejercicio realizado una sola vez puntual, se denomina ejercicio agudo o adaptación aguda al ejercicio.
- Si el ejercicio se realiza con una periodicidad, como en un entrenamiento, hablamos de adaptación crónica al ejercicio.

2. FASES DEL EJERCICIO

Si consideramos el ejercicio físico como un estrés que se le impone al organismo, este produce una serie de respuestas. Sea cual sea la clasificación utilizada, todo ejercicio tiene unas fases.

2.1. FASE DE ENTRADA

Es el periodo que se atraviesa desde el estado de reposo al de actividad. No todas las funciones terminan de activarse al mismo tiempo (por ejemplo, presión arterial, VO_2 , FC) por lo que es una fase donde predomina el metabolismo anaeróbico. Se produce el llamado déficit de oxígeno (Figura 8) porque las demandas de O_2 son mayores que la captación y distribución del mismo. Esta deuda se salda al terminar el ejercicio como veremos.

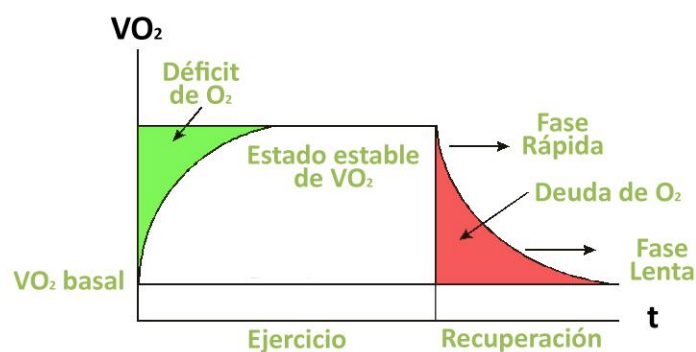


Figura 8. Esquema de las fases de consumo de oxígeno durante el ejercicio.

Modificada de (Wilmore y Costill 2004).

2.2. FASE DE ESTABILIZACIÓN

También llamado estado estable, o “steady state”. En esta fase el VO_2 y el gasto cardiaco alcanzan una meseta, ya que aparece un equilibrio entre demanda y oferta de oxígeno y sustratos energéticos en los tejidos activos, principalmente los músculos (Figura 8).

2.3. FASE DE FATIGA

Se produce debido a que la demanda de energía es mayor que su producción. Esto, a su vez, puede deberse a la depleción de los sustratos energéticos, a la insuficiencia de oxígeno en las células, a la poca eficiencia de las enzimas que catalizan estas reacciones, a problemas derivados del desgaste mecánico de las fibras, etc. Aparece sólo en los ejercicios máximos, ya que en los submáximos el ejercicio finaliza antes de que se alcance esta fase.

2.4. FASE DE RECUPERACIÓN

Esta fase comienza una vez se ha terminado el ejercicio físico, ya sea por agotamiento o por decisión propia. Se produce un descenso de la captación de O₂, de la FC, de la presión arterial, etc. que poco a poco van acercándose a los niveles de reposo. Se produce en dos fases. Una rápida en la que el descenso es brusco y que dura aproximadamente un minuto y una fase lenta en la que se llega hasta el estado de reposo (Figura 8).

3. ADAPTACIONES AL EJERCICIO

Como hemos visto durante el ejercicio se producen una serie de cambios coordinados en los órganos y sistemas. Además, debemos diferenciar las adaptaciones que se producen debido a un ejercicio agudo y las adaptaciones crónicas, que se producen como consecuencia de un entrenamiento. A continuación veremos las más importantes:

3.1. SISTEMA CARDIOVASCULAR

Como bien sabemos, el sistema cardiocirculatorio es un sistema de conducción que está formado por una bomba (el corazón) que mueve un fluido (sangre) a través de unos canales (vasos sanguíneos). Gracias a esta configuración se realizan varias funciones, siendo la principal la de distribución. Distribuye oxígeno y nutrientes por todas las células del organismo y recoge de ella los productos de desecho generados durante la respiración celular. Pero no es esta su única función, ya que a través de ella viajan hormonas, contribuye a la inmunidad, sirve como regulador del pH, de la temperatura corporal, etc.

Todas estas funciones son muy importantes durante el ejercicio. Al aumentar las necesidades metabólicas, este sistema de transporte se ve también más solicitado. Las variaciones se aprecian en todos sus componentes, ya que hay variaciones relativas al corazón, a la sangre y a los vasos.

La FC es uno de los indicadores más sencillos e informativos sobre el nivel de esfuerzo realizado. Simplemente tomando el pulso podemos estimar la intensidad del ejercicio que estamos realizando. En reposo, la FC normal se sitúa entre 60 y 80 latidos por minuto (lpm), aunque en sujetos sedentarios y de mediana edad esta FC puede superar los 100 lpm.

Esfuerzo físico agudo, estrés oxidativo y melatonina

La FC aumenta con la actividad diaria, y más concretamente en los instantes previos a un ejercicio programado. Esta elevación se debe al aumento del tono del sistema nervioso simpático, que libera noradrenalina (NA) y a la liberación de adrenalina por la médula suprarrenal. A estos factores se une la disminución del tono vagal, lo que nos permite estar más alerta ante una inminente situación de estrés (Tresguerres y Ariznavarreta 2006).

Al comenzar un esfuerzo, sobre todo si este es de resistencia, la FC aumenta progresivamente en proporción a la intensidad del ejercicio hasta llegar a una meseta en la que se estabiliza. Es lo que hemos llamado antes “estado estable”. Si el esfuerzo aumenta, la FC lo hace en igual medida hasta que se estabiliza de nuevo. Cuando el ejercicio se prolonga mucho o si la intensidad alcanzada es máxima, la FC aumentará hasta llegar a un límite superior, que llamaremos FC máxima. En ejercicios de fuerza el aumento es menor, ya que no hay suficiente tiempo para que se produzca la adaptación. La FC máxima es un valor que se mantiene constante de un día para otro y que cambia poco con la edad o el entrenamiento, por lo que puede ser útil a la hora de definir intensidades de ejercicio tomando este valor como referencia (Wilmore y Costill 2004).

Además de la FC, el otro parámetro que define la efectividad del corazón al bombear sangre es el volumen de sangre que se envía en cada latido. Es lo que llamamos volumen sistólico (Vs). Su producto se conoce como gasto cardíaco (Q) y muestra el volumen de sangre bombeado por minuto. Durante el esfuerzo, el Vs cambia para permitir al corazón trabajar con mayor eficacia. Está determinado por el volumen de sangre venosa que retorna al corazón, por la capacidad de distensión que tiene el ventrículo y la fuerza de contracción que es capaz de desarrollar. Al comenzar el ejercicio, el Vs aumenta rápidamente hasta el 40 o 60 % de su capacidad máxima. Cuando llega cerca del máximo de la capacidad del ventrículo, el Vs se mantiene casi estable, aumentando muy poco. En este momento, para seguir aumentando Q se recurre al aumento de la FC (Figura 9).

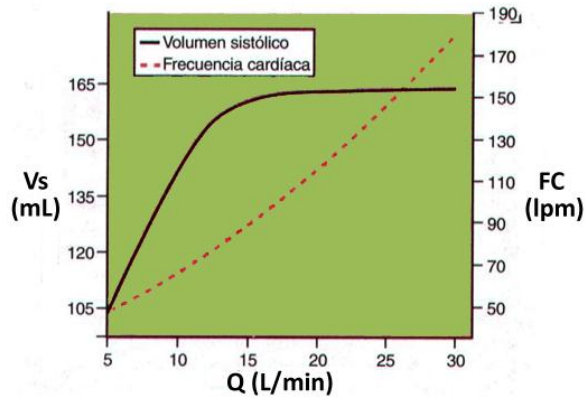


Figura 9. Relación entre gasto cardíaco (Q), volumen sistólico (Vs) y frecuencia cardíaca (FC) en latidos por minuto (lpm).

Adaptada del Tratado de Fisiología Médica (Guyton y Hall 2006).

En reposo el Vs en una persona no entrenada es aproximadamente de 50-60 mL, mientras que gracias al entrenamiento de resistencia puede llegar a ser de 80-110 mL. Si el ejercicio que realizamos es en una posición vertical, el Vs puede aumentar debido al esfuerzo hasta 100-120 mL y si la actividad la hace una persona que realiza actividad física de manera habitual, el valor puede llegar hasta 160-200 mL. Por el contrario, si el ejercicio es en posición supina, el aumento es mucho menor debido a que la sangre fluye con menos resistencia en esta posición, porque no debe vencer la fuerza de la gravedad en su retorno al corazón. Como hemos visto el retorno venoso era uno de los factores que influían en el Vs. Si para que se produzca el retorno venoso es necesario que aumente la presión, entrará más sangre en el corazón, lo que distenderá más el ventrículo, haciendo que sea eyectada con más fuerza. Es el llamado mecanismo de Frank-Starling (Wilmore y Costill 2004).

Si, como hemos visto, debido al ejercicio agudo aumenta tanto la FC como el Vs, la relación que los une también aumentará. Esta relación se denomina gasto cardíaco. El gasto cardíaco es el producto de la FC por el Vs ($Q = FC \times Vs$). Este aumento es lineal conforme al nivel de esfuerzo (Figura 9). En reposo este valor es de unos 5-6 L ($Q = 80 \text{ lpm} \times 70 \text{ mL}$), aunque durante un esfuerzo máximo puede aumentar hasta 20-40 L ($Q = 195 \text{ lpm} \times 180 \text{ mL}$) en función de la masa corporal.

La consecuencia del aumento del gasto cardíaco es un aumento de la presión que ejerce la sangre sobre los vasos. Debemos distinguir 2 tipos: la presión arterial sistólica (PAS), que es la presión que soportan las arterias durante la contracción ventricular o sístole y la presión arterial diastólica (PAD), que es la presión residual que queda durante la diástole o relajación de los ventrículos cardíacos. En ejercicios de resistencia la PAS aumenta en

proporción directa a la intensidad y en personas jóvenes es normal observar valores de hasta 240 – 250 mm Hg (Berne, Levy y cols. 2009). Este aumento se debe al aumento de Q. Al bombear más volumen de sangre y mayor número de veces la presión que esta ejerce sobre los vasos es mayor. Esta adaptación ayuda a conducir la sangre más rápidamente y aumenta el fluido que sale de los capilares, lo que permite una mejor irrigación de los tejidos activos, aumentando el hematocrito debido a la disminución del volumen de plasma. Esta hemoconcentración durante el ejercicio físico agudo supone una mejora en el rendimiento del sistema de transporte de oxígeno en un momento en el que el organismo necesita más oxígeno por el alto consumo muscular. Por contrario la PAD cambia poco o nada en ejercicios de resistencia. No hay cambios de más de 15 mm Hg ya que es un ejercicio que no afecta a la distensibilidad vascular. Sin embargo, en ejercicios de fuerza ambas aumentan de forma considerable, ya que la tensión generada de manera mantenida por el músculo comprime los vasos, lo que disminuye su radio y aumenta la presión que ejerce sobre ellos la sangre que circula por dentro. En este tipo de ejercicios, la PA puede alcanzar valores que superen 480-350 mm Hg. (MacDougall, Tuxen y cols. 1985) gracias al bloqueo de la glotis, que incrementa la presión intratorácica, contrayendo los vasos principales que pasan por esa zona. A esta compresión se le denomina “maniobra de Valsalva”.

Ya hemos visto las adaptaciones que sufre el corazón, la bomba de este sistema. Pero el sistema vascular también se adapta para satisfacer las necesidades corporales durante un esfuerzo. Se produce una redistribución de sangre hacia los tejidos que más necesidades tienen, en este caso los más activos. Esta redistribución se produce en un primer momento gracias a la acción del SN simpático, igual que sucedía con el corazón. Es lógico pensar que el mecanismo que prepara al corazón frente al estrés que supone el ejercicio, regule una adaptación de otras áreas del sistema. De este modo provoca una vasoconstricción en el sistema digestivo y en los riñones, que son zonas que no van a tener apenas actividad y produce una vasodilatación muscular, que va a ser el tejido más activo. Existen órganos que deben mantener una irrigación constante debido a su importancia. El cerebro mantiene un flujo constante de sangre mientras que el corazón recibe un porcentaje constante del Q para cualquier tipo de esfuerzo.

Debido al aumento del metabolismo, aumenta la acidez, la concentración de CO₂ y la temperatura, a la vez que hay un descenso de la presión parcial de O₂ a nivel tisular. Esto provoca una autorregulación que aumenta el flujo de sangre hacia los capilares de los territorios que necesitan más energía y eliminar los productos de desecho, entre los que se incluyen los radicales libres. Gracias a este aumento de la acidez y de la temperatura, la curva

de saturación de la hemoglobina (Hb) se desplaza a la derecha, o lo que es lo mismo, se libera más oxígeno ya que este se disocia de la Hb con más facilidad (Guyton y Hall 2006). Sin embargo, debido al aumento de la velocidad de circulación de la sangre al pasar por los capilares y a la acción de los radicales libres sobre las membranas eritrocitarias, durante la actividad física se produce una hemólisis que reduce, aunque ligeramente, la cantidad de glóbulos rojos disponibles para el transporte de oxígeno (Wilmore y Costill 2004).

Una vez vistas las adaptaciones agudas que se sufren debido al estrés que supone un ejercicio puntual, vamos a ver las modificaciones que lleva a cabo nuestro organismo para adaptarse a un entrenamiento, es decir, una serie de estímulos consecutivos.

Comenzaremos con el corazón. Este órgano sufre una serie de variaciones como respuesta a la mayor demanda de esfuerzo. Tras un entrenamiento de resistencia el corazón aumenta su volumen, su peso y el grosor de su pared ventricular. Esto es debido a que tras una sollicitación superior a la habitual, el miocardio se hipertrofia al igual que puede suceder con el músculo esquelético. Esta adaptación se conoce como “Corazón del deportista”, que no debe confundirse con la hipertrofia ventricular izquierda. En esta patología la pared ventricular también aparece engrosada, pero tiene asociada una disminución en su capacidad contráctil y en el volumen sistólico (Wilmore y Costill 2004).

El Vs sufre un incremento global debido al ejercicio. En una situación de reposo es bastante más alto que en personas que no han entrenado y además durante la realización de ejercicios submáximos y máximos también es mayor (Tabla II). Estos valores son relativos ya que hay que tener en cuenta que el Vs depende del tamaño de la persona.

Tabla II. Volumen sistólico(Vs) de diferentes grupos de personas.

Adaptada de (Wilmore y Costill 2004).

<u>Sujetos</u>	<u>Vs reposo</u> (mL)	<u>Vs máx</u> (mL)
No entrenados	50 – 70	80 – 110
Entrenados	70 – 90	110 – 150
Alto rendimiento	90 – 110	150 – >220

Además debemos saber que, debido al entrenamiento, se produce un aumento del volumen plasmático, posiblemente debido a mecanismos hormonales o al aumento de las proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina (Yang, Mack y cols. 1998). Esto unido a la disminución de la agregación plaquetaria que produce el entrenamiento, reduce la viscosidad sanguínea y facilita su circulación por los vasos (Lippi y Maffulli 2009). La hemodilución provocada por el entrenamiento supone durante el reposo menores necesidades cardiocirculatorias con disminución del trabajo cardíaco y de las resistencias periféricas.

Sabemos que el ventrículo izquierdo se llena más, ya que debe eyectar sangre a un área mayor que el derecho. Esto, unido al aumento del volumen plasmático, hace que haya más sangre disponible y se produce un incremento en el volumen diastólico final. Al producirse un mayor llenado ventricular, por el mecanismo de Frank-Starling, la contracción es mayor. Debido a esto el V_s final, es decir, el volumen de sangre que permanece en el ventrículo después de la eyección, se reducirá, haciendo que la fracción de eyección aumente.

En lo que se refiere a la FC, se ha observado que sufre un descenso en estado de reposo, lo que puede ser debido al predominio parasimpático tras el ejercicio o a un aumento del V_s , lo que mantendría el gasto cardíaco con un FC menor. Del mismo modo, en ejercicios de tipo submáximo, podemos ver también que frente a un mismo nivel de esfuerzo la FC es menor, mientras que la FC máx tiende a ser estable, aunque puede disminuir para optimizar el gasto cardíaco. Otra de las adaptaciones que sufre la frecuencia de latidos del corazón es que tras un ejercicio el tiempo que tarda la FC en volver al ritmo de reposo, o sea, el periodo de recuperación de la FC, se reduce con el entrenamiento. Este parámetro puede usarse para determinar el grado de mejora que tiene una persona que está siguiendo un entrenamiento.

Si tenemos en cuenta las adaptaciones que tienen estas dos variables podemos conocer los cambios en el gasto cardíaco. Gracias al entrenamiento, el cuerpo se adapta para mantener la mejor relación FC y V_s . Con FC muy altas el tiempo de llenado es menor y el V_s disminuye. Por lo tanto, el corazón optimiza su rendimiento llegando a FC donde el V_s también sea óptimo, como antes hemos visto. En reposo o durante un ejercicio submáximo, el gasto cardíaco no cambia apenas, ya que nuestras necesidades metabólicas son similares a las que teníamos antes de entrenar. Pero en ejercicios máximos Q aumenta considerablemente debido, sobre todo, al V_s . Q máximo oscila entre 14 – 20 L/min en personas no entrenadas, 25 – 35 L/min en sujetos entrenados y alcanza más de 40 L/min en deportistas de alto rendimiento (Wilmore y Costill 2004).

La presión arterial está asociada a la eficiencia del corazón en el bombeo de sangre. Los vasos reciben un mayor volumen de sangre que además es bombeada con más fuerza. Después de un programa de entrenamiento, se puede observar que ante ejercicios submáximos o incluso máximos, la PA no sufre apenas cambios en personas normotensas. Por el contrario en reposo, las PA de personas hipertensas se reducen. Concretamente la PAS disminuye unos 10 mm Hg y la PAD 8 mm Hg de media (Wilmore y Costill 2004).

En lo que se refiere a riego sanguíneo, podemos observar que se produce una mejora en el aporte sanguíneo a los músculos activos debido a cuatro factores (Guyton y Hall 2006; Hermansen y Wachtlova 1971):

- Una mayor capilarización de los músculos entrenados. O lo que es lo mismo un aumento del ratio capilares/fibras.
- Mayor vasodilatación de los capilares existentes en los músculos entrenados, gracias a la acción de la NOS.
- Una redistribución de la sangre más efectiva.
- Un incremento del volumen sanguíneo.

Además, se produce un aumento de la eritropoyesis en la médula ósea. Durante un ejercicio agudo no hay tiempo de que los mecanismos eritropoyéticos actúen, sin embargo, gracias al entrenamiento se produce un aumento de la concentración de reticulocitos y de la secreción de eritropoyetina (EPO). La posible causa de esto es la falta de oxígeno en las células del epitelio de los túbulos renales, que la segregan. A pesar de que el número de hematíes aumenta con el entrenamiento, lo hace aun más el volumen plasmático. De ahí la hemodilución que se produce (Green, Sutton y cols. 1991).

Todos estos factores unidos a la mayor diferencia arterio-venosa de O₂, gracias a una mayor eficacia del aporte de O₂ a los tejidos, son los que hacen que nuestro rendimiento cardiovascular aumente gracias al entrenamiento.

3.2. SISTEMA RESPIRATORIO

El sistema respiratorio es el encargado de introducir oxígeno en el cuerpo y eliminar el CO₂, por lo que independientemente de la eficacia de nuestro sistema cardiocirculatorio, la capacidad de resistencia disminuirá si no se aporta suficiente oxígeno a la sangre. Tiene además un papel importante en la regulación del pH, debido al intercambio gaseoso que

Esfuerzo físico agudo, estrés oxidativo y melatonina

realiza. No suele ser un factor limitante en el ejercicio, ya que la ventilación pulmonar puede aumentarse en mayor medida que la distribución a través de la sangre, pero aún así este sistema sufre una serie de adaptaciones. Se debe a que durante un esfuerzo, sus funciones se ven aumentadas.

El proceso de la ventilación pulmonar consta de dos fases. Una inspiración en la que penetra aire en los pulmones debido a la diferencia de presión que se genera y otra de espiración en la que este aire sale. Durante el ejercicio la ventilación se ve aumentada, se vuelve más corta y profunda. Para ello se crea una presión intratorácica más negativa y de forma más rápida gracias a la acción de los músculos respiratorios diafragma, intercostales externos, escalenos, pectoral y esternocleidomastoideo. La segunda fase, la de espiración también se vuelve más corta. Ya no es pasiva, como en reposo, ya que entran en acción el diafragma, los músculos abdominales e intercostales internos. Además los cambios de presión intratorácica e intraabdominal favorecen también el retorno venoso hacia el corazón. La ventilación pulmonar se incrementa en dos fases: una inmediata y repentina seguida por otra continua y progresiva de la profundidad y el ritmo respiratorio. De 12 ventilaciones por minuto (v/min) en reposo, se pueden alcanzar ritmos de hasta 45 -50 v/min. Gracias a ello, el volumen de aire que entra y sale de los pulmones durante un esfuerzo puede alcanzar los 120 L/min en sujetos pequeños y 200 L/min en sujetos grandes, mientras que en reposo es únicamente de unos 5-6 L/min (Wilmore y Costill 2004).

El siguiente paso en el proceso de la respiración es la difusión pulmonar. En ella, el oxígeno atraviesa la membrana alveolar hacia la sangre a la vez que el CO₂ difunde desde la sangre hacia el aire alveolar. Este proceso es posible debido a la diferencia de las presiones parciales de los gases entre los alveolos y la sangre. Se crea un gradiente de presión a través de la membrana respiratoria que favorece el intercambio. Durante el ejercicio este gradiente aumenta ya que cuanto más grande es, más rápido difunden los gases. Gracias al incremento de la ventilación y de la difusión pulmonar el consumo de oxígeno (VO₂) pasa de unos 200 mL/min hasta aproximadamente 6000 mL/min (Guyton y Hall 2006). Tanto el O₂ como el CO₂ viajan a través de la sangre de los capilares pulmonares hacia las células del cuerpo y regresan a los pulmones. Estos gases son transportados de forma diferente. El oxígeno circula unido a hemoglobina (98%) o disuelto en el plasma (2%), mientras que el CO₂ lo hace disuelto en plasma (7-10%), en forma de iones bicarbonato (60-70%) o combinado con la hemoglobina (20-30%) formando carboxihemoglobina. Cada molécula de Hb presente en los hematíes puede transportar 4 de oxígeno. La combinación del gas con la proteína depende de la presión parcial de O₂ (PO₂). Si es alta, se llega a producir una saturación casi completa de la Hb.

Además como ya hemos dicho antes, factores como la temperatura y el pH también influyen (Figura 10).

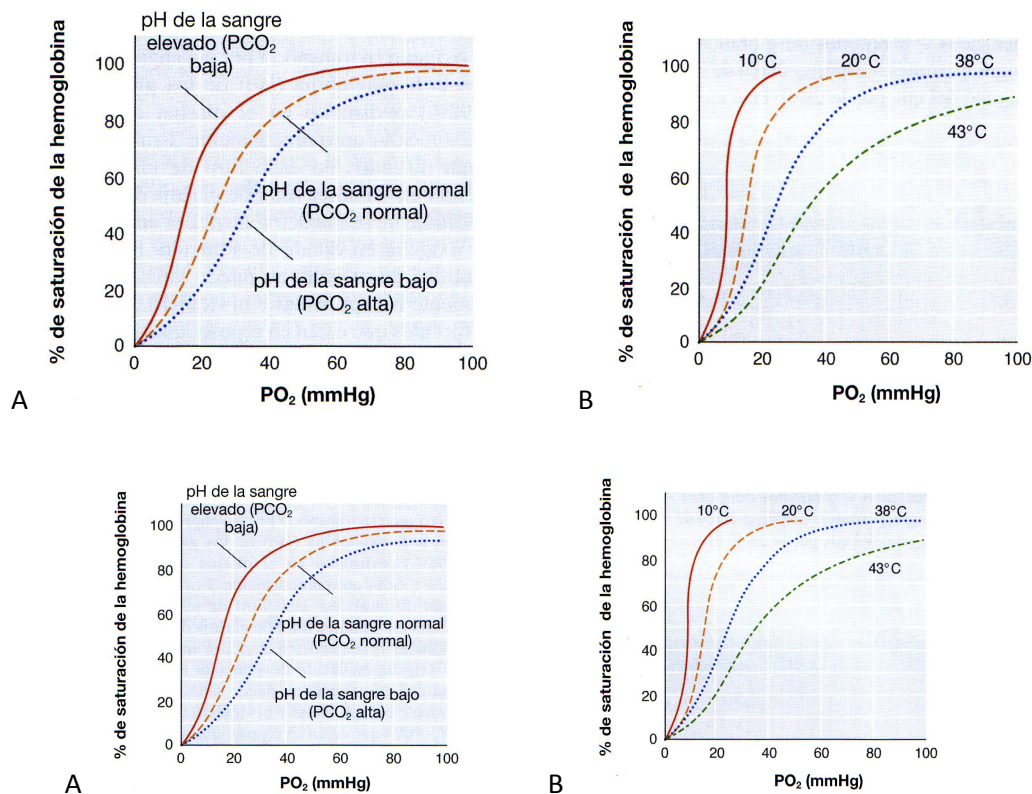


Figura 10. Efecto del pH (A) y de la temperatura (B) en la curva de saturación de la hemoglobina.

Adaptada de (Wilmore y Costill 2004).

El contenido de oxígeno en la sangre arterial que viene de los pulmones después del intercambio del oxígeno y del dióxido de carbono es de 20 mL por cada 100 mL de sangre. Una vez que la sangre atraviesa los capilares este valor cae hasta 15 – 16 mL en sangre venosa debido a la captación de oxígeno por parte de las células del organismo. Por tanto la diferencia entre el oxígeno que hay en las arterias y el que hay en las venas (diferencia arterio-venosa) es de 4-5 mL, en reposo. Durante un ejercicio aeróbico intenso, en el que la demanda de este gas por parte de las células musculares activas aumenta, esta diferencia puede subir hasta 15 mL (Guyton y Hall 2006).

En resumen, los factores que influyen en el transporte y difusión del oxígeno por el organismo son:

- El contenido de oxígeno de la sangre, mayor cuanto más saturada esté la Hb.
- Mantenimiento de la PO₂, ya que si disminuye esta presión parcial en la sangre, la difusión de oxígeno a los tejidos se verá limitada.

Esfuerzo físico agudo, estrés oxidativo y melatonina

- Intensidad del flujo de sangre. Cuanta más sangre se encuentre circulando por los músculos habrá una mayor disponibilidad de oxígeno para la obtención de energía.
- Las condiciones locales del tejido influyen debido a que si se produce un aumento de la temperatura y de la acidez se favorecerá la disociación de la Hb y el O₂.

Todas estas adaptaciones se deben a un estímulo aislado de ejercicio y nuestro organismo responde de manera similar cada vez que este se presenta. Pero si es sometido a un programa de entrenamiento, el cuerpo sufre adaptaciones que le permiten afrontar el estímulo de nuevo en mejores condiciones. Las adaptaciones que se dan en el sistema respiratorio comienzan por adaptaciones de la ventilación pulmonar. En reposo, se mantiene invariable. Pero cuando nos enfrentamos a un ejercicio aumenta sustancialmente y puede pasar de 120 L/min de aire que moviliza una persona no entrenada hasta 180-200 L/min en deportistas muy entrenados. Esto es debido a la mayor frecuencia respiratoria, gracias a la adaptación de los músculos respiratorios y al aumento del volumen tidal. A esto se suma el incremento de la difusión pulmonar que aunque no varía en reposo ni en ejercicios de intensidad submáxima, sí que se produce un aumento en los ejercicios máximos gracias a un incremento del flujo de sangre pulmonar, especialmente hacia las zonas superiores, normalmente menos irrigadas. Como consecuencia, hay más sangre en los alveolos pulmonares para captar el oxígeno y transportarlo hacia las células (Wilmore y Costill 2004).

Gracias a las adaptaciones descritas obtenemos una cantidad mayor de oxígeno en la sangre. Además, debido al entrenamiento conseguimos que la diferencia arterio-venosa sea mayor, lo que sucede principalmente en los ejercicios máximos, mientras que en reposo o en los ejercicios submáximos no varía, quizá debido a que no es necesario extraer tanto oxígeno por los músculos. Como vemos además de captar más oxígeno, nuestro organismo es capaz de hacer llegar a las células este oxígeno.

El valor que resume todos estos procesos es el consumo de oxígeno (VO₂), ya que viene determinado por la capacidad de ventilación y difusión pulmonar, la de transporte y la de captación de este por las células. Por ello es un valor muy utilizado a la hora de definir el estado de forma de los deportistas. En reposo, se produce un ligero aumento de este en deportistas muy entrenados, debido al aumento de su metabolismo basal, y durante ejercicios submáximos no se aprecia apenas alguna variación. El VO₂ máximo (VO₂ máx) es el ritmo más alto de consumo de oxígeno alcanzable al realizar esfuerzos físicos. Cuanto mayor sea la

intensidad de nuestro ejercicio, el VO_2 irá aumentando hasta alcanzar un tope, a partir del cual aunque se produzca un incremento de la intensidad, el VO_2 se estabilizará o reducirá ligeramente. Gracias al entrenamiento de resistencia este límite puede estar más alto ya que aumenta nuestro VO_2 máx, lo que nos permite consumir más oxígeno para obtener energía (Pollock 1973).

3.3. ADAPTACIONES METABÓLICAS

Los músculos esqueléticos, al igual que la mayoría de las células del organismo, pueden obtener la energía necesaria para sus funciones vitales de varias fuentes energéticas. La principal función celular del músculo esquelético es la de contraerse, para lo que requiere una cantidad de energía importante. La cantidad de energía que necesita y la rapidez con la que la demande, definirán que vía metabólica utiliza preferentemente para conseguirla. De esta manera la energía necesaria para ejercicios de ligera o moderada intensidad o de larga duración, proviene fundamentalmente de la vía aeróbica, es decir del metabolismo de los hidratos de carbono y las grasas con la participación del oxígeno. En general, podemos afirmar que la energía necesaria para realizar actividades físicas de larga duración proviene fundamentalmente de la oxidación de sustratos en las mitocondrias, con una pequeña aportación de las reacciones anaeróbicas que tienen lugar en el citosol. Como ya hemos visto antes, la mitocondria es la principal fuente de radicales libres.

Cuando se demanda una cantidad de energía de forma más rápida se utiliza la vía anaeróbica. La principal limitación que tiene esta vía es que, si bien puede proporcionar energía de manera más rápida que la aeróbica, proporciona mucha menos. Además, se producen una serie de “productos de desecho”, que varían las condiciones del músculo. Entre estos se encuentra el ácido láctico o su base conjugada, lactato. Gracias a la medición de la concentración del lactato, podemos estimar el uso que se ha llevado a cabo de esta vía metabólica por parte de las células. No obstante, parece claro que conseguir la energía exclusivamente de un sistema energético es muy difícil, debido al solapamiento de todas las vías, aunque siempre predomina una sobre las otras (López Chicharro y Aznar Laín 2004).

Según el planteamiento clásico, el sistema anaeróbico glucolítico predominaba sobre el aeróbico hasta los 120 segundos de ejercicio, momento en el que se producía la transición hacia la predominancia aeróbica. Esto se debe a que la activación de la vía aeróbica no es inmediata sino que tarda un tiempo en ponerse al nivel de las exigencias energéticas. Describe una curva como la que hemos visto en la Figura 8, que representa la evolución del consumo de

oxígeno durante un ejercicio. Este planteamiento se ha cuestionado, ya que se ha comprobado que a partir de los 60 segundos de ejercicio la vía aeróbica cobra un protagonismo mayor que el de la vía anaeróbica glucolítica que ya no es tan importante (Yamamoto y Kanehisa 1995).

En ejercicios con un aumento de la intensidad progresivo, este déficit de oxígeno es muy pequeño y la energía necesaria se obtiene de la oxidación de ácidos grasos e hidratos de carbono desde el comienzo. A medida que se incrementa la intensidad, y por tanto la necesidad de energía, se suma a esta vía la anaeróbica glucolítica. La acción de esta vía provoca la aparición de lactato en sangre a partir de cierta intensidad de trabajo en ejercicios progresivos. Este punto se conoce como “umbral anaeróbico” y se debe a la incapacidad de aportar el suficiente oxígeno a las células activas (Hill, Long y cols. 1924). Aceptando este hecho, la deficiencia de oxígeno en los tejidos depende de factores tanto cardiocirculatorios, respiratorios como metabólicos, de ahí que aparezcan adaptaciones en todos estos sistemas.

Si continúa creciendo la intensidad del ejercicio, llegará un momento en que no se pueda consumir más oxígeno. Se habrá alcanzado el VO_2 máx. Este punto será el límite de la producción de energía gracias a la vía oxidativa. Con un trabajo de esta intensidad, ya hay un aporte de energía conjunto por parte de las vías aeróbica y anaeróbica aunque se podrá seguir aumentando la intensidad hasta que todas las vías metabólicas estén produciendo su máxima energía. En este punto se alcanza la intensidad máxima de trabajo.

Esta producción de lactato por el músculo es la responsable de las variaciones en las condiciones locales de las que hablábamos en el apartado de “Adaptaciones respiratorias”. Gracias al aumento de la concentración de ácido láctico disminuye el pH local, lo que permite una mejor disociación del oxígeno de la hemoglobina. Por esta razón puede aprovecharse mejor el oxígeno transportado por lo hematíes. Por el contrario, si este aumento de la acidez es muy grande podría afectar a la actividad de las enzimas que catalizan las reacciones de producción de energía. Es por ello que poseemos un sistema amortiguador de la acidez, y que está muy relacionado con la ventilación pulmonar. Es el sistema tampón del bicarbonato. Al actuar frente a la gran cantidad de hidrogeniones (H^+) se forma ácido carbónico que rápidamente se disocia en CO_2 y agua, fácilmente eliminables por la respiración. De ahí que haya un incremento de la ventilación a pesar de que no podamos consumir más oxígeno (Guyton y Hall 2006).

Una vez conocidas las adaptaciones que sufre nuestro metabolismo debidas a la actividad física, veremos cómo influye en estos sistemas el entrenamiento.

Como hemos visto antes, el entrenamiento produce un aumento de la capacidad aeróbica y somos capaces de consumir más oxígeno durante un ejercicio máximo, o dicho con otras palabras, se produce un incremento del VO_2 máx. Hay muchos estudios que demuestran que gracias al entrenamiento aumenta este parámetro (Getchell y Moore 1975; Hickson, Kanakis y cols. 1982; Orlander, Kiessling y cols. 1977). Este aumento está definido, además de por el entrenamiento, por factores no del todo conocidos. Siguiendo un mismo programa de entrenamiento se han visto incrementos en distintas personas que van desde el 4% hasta el 93%, aunque la media se sitúa entre el 15% al 20% (Pollock 1973).

La limitación en el ejercicio se debe fundamentalmente a la falta de aporte de oxígeno a los tejidos, y estas mejoras se deben a una mejor perfusión de los músculos y a un aumento del gasto cardíaco y volumen sanguíneo (Saltin y Rowell 1980). Estas adaptaciones musculares, incluido el mayor número de mitocondrias y el incremento del umbral anaeróbico, que se sitúa más próximo al nivel del VO_2 máx., están relacionadas con la mayor capacidad para realizar ejercicios de resistencia (Holloszy y Coyle 1984).

EJERCICIO FÍSICO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

La primera vez que se sugirió que el ejercicio estaba asociado a un incremento del estrés oxidativo fue en los años 70, cuando Dillard (1978) y Brady (1979) demostraron un incremento de la peroxidación lipídica tanto en humanos como en ratas. Ya en los años 80, Davies y sus colaboradores encontraron la primera evidencia de que en el músculo se daba una producción de EROs, lo que producía estrés oxidativo (Davies, Quintanilha y cols. 1982). Esta situación suponía que el ejercicio físico era potencialmente dañino para los músculos. Como ya se conocía el papel de la mitocondria en la producción del radical superóxido y de peróxido de hidrógeno (Boveris y Chance 1973), esta era una explicación posible a este aumento en la concentración de radicales libres.

El siguiente paso era comprobar qué sustancias podían protegernos de este daño, por lo que comenzó a estudiarse el papel de los antioxidantes en la protección de los orgánulos celulares del daño oxidativo (Davies, Maguire y cols. 1982; Quintanilha, Packer y cols. 1982). En otros estudios, Jackson comprobó los posibles beneficios de la vitamina E en la reducción del daño muscular debido al ejercicio físico (Jackson, Jones y cols. 1983) y que la depleción de esta vitamina producía un incremento del daño en la membrana muscular debido a la contracción muscular (Jackson, Edwards y cols. 1985). Estos hallazgos impulsaron el estudio del efecto de la suplementación con este y otros antioxidantes en el daño oxidativo en diversos tejidos,

viendo que los antioxidantes producía un descenso de los marcadores de estrés oxidativo (Goldfarb, McIntosh y cols. 1994; Kanter, Bullard y cols. 1993; Kumar, Reddy y cols. 1992).

Hasta ese momento se utilizaban únicamente técnicas que medían los productos de la reacción de estos radicales libres con lípidos (Brady, Brady y cols. 1979; Dillard, Litov y cols. 1978), aunque Jackson y Davies (Davies, Quintanilha y cols. 1982; Jackson, Edwards y cols. 1985) utilizaran también la espectroscopía de resonancia de *spin* electrónico para examinar las especies reactivas relativamente estables en los tejidos. Mediante este tipo de estudios se observó la liberación de $\cdot\text{O}_2^-$ por el músculo en contracción (Reid, Haack y cols. 1992; Reid, Khawli y cols. 1993; Reid, Shoji y cols. 1992), se demostró la generación de $\cdot\text{NO}$ por el músculo esquelético (Balon y Nadler 1994; Kobzik, Reid y cols. 1994) y se detectó la formación de $\cdot\text{OH}$ por tejido muscular activo (Diaz, Brownstein y cols. 1994; O'Neill, Stebbins y cols. 1996).

Como ya hemos visto anteriormente, la SOD es una enzima fundamental en la regulación del estado redox de la célula, por lo que su actividad durante el ejercicio y su variación durante y después del mismo fueron investigadas durante la década de los 80 (Alessio y Goldfarb 1988; Higuchi, Cartier y cols. 1985; Jenkins, Friedland y cols. 1984; Kanter, Hamlin y cols. 1985). La habilidad del cuerpo de adaptarse tanto a ejercicio agudo como crónico y elevar la capacidad antioxidante está descrita en corazón, aparato respiratorio y en músculo esquelético (Criswell, Powers y cols. 1993; Hammeren, Powers y cols. 1992; Ji 1993; Ji, Fu y cols. 1992; Ji, Stratman y cols. 1988; Powers, Criswell y cols. 1994; Powers, Criswell y cols. 1994; Powers, Criswell y cols. 1993), sobre todo en las fases tempranas de la recuperación (Tian, Nie y cols. 2010).

Paralelamente se estudió el rol que tenía un antioxidante de bajo peso molecular, el glutatión, en la regulación de la actividad de los radicales libres en el ejercicio. Se comprobó que los niveles de este variaban debido a la actividad física, y que su contenido y el estado redox de la célula cambiaban después de seguir un entrenamiento de resistencia (Sen, Atalay y cols. 1994; Sen, Marin y cols. 1992). También se comprobó que la suplementación con antioxidantes previene la oxidación del glutatión presente en sangre (Sastre, Asensi y cols. 1992).

Ya en los años 90, se estudió el papel que tienen las EROs producidas en la contracción del músculo en su función, y como el estado redox de la célula es capaz de modular los procesos de señalización celular (Sen 2001). Gracias a estos estudios se abrió un campo que continúa en la actualidad y que pretende más que comprobar los cambios en los marcadores

de estrés oxidativo y su prevención, entender el funcionamiento redox de la célula muscular y el ejercicio.

1. FUENTES DE RADICALES LIBRES EN EL EJERCICIO

Hemos expuesto previamente las mayores fuentes de radicales libres que hay en el cuerpo humano. Sin embargo, en una situación concreta y que produce cambios tan importantes como es el ejercicio físico, que merece la pena volver a incidir en los procesos que más influyen en la generación de especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno. La mayoría de los estudios no se preocupan de la fuente sino más bien de los efectos de este estrés oxidativo, como en el primer estudio de Dillard (1978). Se asume que el músculo es el principal origen de radicales libres durante el ejercicio, aunque otros tejidos como el cardiaco, el pulmonar o los glóbulos blancos pueden contribuir significativamente a la producción de EROs.

Debido a la naturaleza invasiva de la obtención de muestras en humanos, los estudios se han centrado en medir marcadores de oxidación en sangre periférica independientemente del ejercicio realizado, lo que puede llevar a resultados contradictorios en algún caso. Se ha comprobado un incremento de LPO (Alessio, Hagerman y cols. 2000; Baker, Bailey y cols. 2004; Childs, Jacobs y cols. 2001; Davies, Quintanilha y cols. 1982; Ji y Fu 1992; Li, Tong y cols. 1999), de la carbonilación proteica (Lamprecht, Greilberger y cols. 2008), daño al ADN (Selman, McLaren y cols. 2002) o rigidez en la membranas celulares (Brzeczczynska, Pieniazek y cols. 2008). Algunos autores sugieren que cambios metabólicos comunes en todos los protocolos de ejercicio como la liberación de catecolaminas y su autooxidación, son los responsables de este incremento en la producción de EROs (Cooper, Vollaard y cols. 2002).

Otra posibilidad es que el proceso inflamatorio que sufre la fibra muscular tras el ejercicio sea el responsable de esta producción de radicales libres, debido a la invasión del área de macrófagos y otras células fagocíticas. Este proceso es esencial para la regeneración muscular pero conlleva una liberación de radicales libres por parte de estas células. Ésta puede llegar a dañar el músculo no dañado por el ejercicio (Butterfield, Best y cols. 2006; Zerba, Komorowski y cols. 1990).

Los mecanismos de producción endógena de radicales libres en el músculo se localizan en varios lugares, siendo las EROs primarias $\cdot\text{O}_2^-$ y NO (Jackson 2005). Una de la fuentes es la mitocondria, que genera principalmente $\cdot\text{O}_2^-$ en la cadena de transporte de electrones. En contra de lo que se ha pensado siempre, esta no es la principal fuente de radicales libres

durante el ejercicio. La mitocondria en estado basal o estado 4 transforma en $\cdot\text{O}_2^-$ entre un 2% y un 5% del oxígeno que consume, mientras que en su estado más activo (estado 3) estimulado por la cantidad de ADP transforma en radical superóxido sólo un 0,1% (St-Pierre, Buckingham y cols. 2002). Esto es importante porque durante el ejercicio, las mitocondrias de los músculo activos se encuentran en este estado, lo que limita su producción de EROs.

La producción de radicales libres depende también del tipo de fibra muscular. Las fibras de contracción lenta o de tipo I producen de dos a tres veces menos H_2O_2 que las de contracción rápida o de tipo II (Anderson y Neuffer 2006), aunque no hay diferencias entre las actividades de la GPx mitocondrial.

Además de la mitocondria, hay varios sitios dentro de la fibra muscular donde se generan EROs que junto a los que se producen en las mitocondrias contribuyen a un aumento de la producción total de radicales libres. En el retículo sarcoplasmático y en los túbulos transversos también se producen, por la vía enzimática de la NAD(P)H oxidasa. La actividad de esta enzima está localizada dentro de la célula, por lo que los radicales libres no difunden al espacio extracelular (Xia, Webb y cols. 2003), además su actividad se ve incrementada debido a los estímulos de despolarización en el proceso de contracción (Espinosa, Leiva y cols. 2006; Hidalgo, Sanchez y cols. 2006). Debido a que es el orgánulo celular que libera Ca^{2+} , el $\cdot\text{O}_2^-$ generado por estas enzimas influye en esta liberación (Cherednichenko, Zima y cols. 2004), lo que puede influir en la contracción muscular. Esta misma reacción catalizada por la NAD(P)H oxidasa se da en la membrana plasmática de las células musculares, membranas que poseen sistemas redox de intercambio de electrones, lo que libera radicales libres en el espacio extracelular (Javesghani, Magder y cols. 2002). Este sistema acepta electrones del NADH de la membrana plasmática y puede reducir sustanciasceptoras de electrones, como los tioles proteicos, aunque el mayor aceptor fisiológico es el oxígeno (de Grey 2003).

A nivel de la membrana celular actúa también la Fosfolipasa A_2 (FLA_2), que parte los fosfolípidos de la membrana para liberar ácido araquidónico, sustrato para la lipooxigenasa, generando radicales libres durante su catálisis (Zuo, Christofi y cols. 2004). La activación de la FLA_2 , estimula la NAD(P)H oxidasa y, por tanto, estimula la producción de EROs en el citosol (Gong, Arbogast y cols. 2006) y la mitocondria muscular (Nethery, Callahan y cols. 2000) y se liberan radicales libres en el espacio extracelular (Zuo, Christofi y cols. 2004).

Otra oxidasa involucrada en la generación de EROs en el ejercicio es la xantina oxidasa. Como ya hemos descrito, durante periodos de hipoxia, isquemia u otras situaciones de déficit energético, como el ejercicio físico, aumenta la producción de radicales libres por esta vía.

Suministrando inhibidores de esta enzima, como el alopurinol o el oxipurinol, disminuyen los niveles de producción de radicales libres durante el ejercicio (Gomez-Cabrera, Pallardo y cols. 2003; Heunks, Machiels y cols. 2001).

En el músculo se genera continuamente $\cdot\text{NO}$, producción que aumenta debido a las contracciones musculares (Balon y Nadler 1994; Kobzik, Reid y cols. 1994). El músculo esquelético expresa en situaciones de reposo las isoformas de la NOS neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS). En un principio se creyó que la primera se expresaba especialmente en las fibras de tipo II y la segunda en la mitocondria (Kobzik, Stringer y cols. 1995). Por el contrario se ha demostrado que la isoforma mitocondrial es una variación de la nNOS (Elfering, Sarkela y cols. 2002). Aunque la isoforma inducible (iNOS) es expresada por el músculo también en periodos de inflamación como los que aparecen tras un ejercicio intenso, la fuente principal de radicales libres es la nNOS (Hirschfield, Moody y cols. 2000; Tidball, Lavergne y cols. 1998).

Sin embargo, son las fuentes no musculares las que más modifican el estado redox muscular cuando se produce daño muscular, principalmente a través de los fagocitos. Estas células, macrófagos fundamentalmente (McArdle, Spiers y cols. 2004), invaden el área muscular dañada, y aunque este proceso es fundamental para la reparación celular, se produce un aumento de las EROs que puede llegar a dañar el músculo aún sano (Malech y Gallin 1987; Zerba, Komorowski y cols. 1990).

Al hablar de la producción de radicales libres durante el ejercicio no se puede generalizar, dado que cada tipo de ejercicio (definido por sus variables de intensidad, duración, etc.) promueve distintas respuestas y adaptaciones sobre el metabolismo del oxígeno.

Los ejercicios anaeróbicos, o de intensidad elevada, son los que ocasionan una mayor producción de radicales libres. Son ejemplos de este tipo de ejercicios los supramáximos realizados durante las series de spints, o de multisaltos, así como los ejercicios en los que predominan las contracciones excéntricas que provocan una gran respuesta inflamatoria. Los mecanismos por los que se produce el aumento de radicales libres durante el ejercicio anaeróbico están relacionados con la producción de xantinaoxidasa, con los mecanismos de isquemia-reperfusión, con el aumento de la actividad fagocítica desencadenada durante los procesos inflamatorios provocados por el ejercicio intenso, así como con la autooxidación de las catecolaminas. La liberación adicional de hierro proveniente de la hemoglobina o la ferritina podría ampliar las respuestas inflamatorias y por ende el estrés oxidativo (Chevion, Moran y cols. 2003).

Por otro lado, dado que durante el ejercicio de baja intensidad (inferior al 50% del consumo máximo de oxígeno) la producción de radicales libres es muy reducida, la actividad de estas moléculas no supera las defensas antioxidantes del deportista, por lo que no se evidencian daños oxidativos cuando el ejercicio físico se practica a estas intensidades. Dichos resultados responden a que el ejercicio aeróbico estimula el aumento de antioxidantes intracelulares así como la capacidad enzimática antioxidante, especialmente en las células inmunitarias, reduciendo por tanto la vulnerabilidad de estos sujetos frente al estrés oxidativo (Dawson, Henry y cols. 2002; Vasankari, Kujala y cols. 1997).

2. FUNCIONES DE LOS RADICALES LIBRES EN EL EJERCICIO

Aunque los radicales libres son subproductos tóxicos del metabolismo celular, existen evidencias de que son necesarios para que la función celular se desarrolle de manera adecuada (Aslan y Ozben 2003; Chiarugi, Pani y cols. 2003; Nathan 2003). Estos radicales libres funcionan en la regulación del crecimiento celular y en respuestas adaptativas como moléculas señalizadoras. Por ejemplo, la señal de transducción inducida por el factor de crecimiento derivado de plaquetas y la transcripción génica inducida por citoquinas, se inhiben al impedir el aumento de la concentración de radicales libres, mediante su eliminación, tanto por antioxidantes químicos como enzimáticos (Dalle-Donne, Rossi y cols. 2001).

Además, los radicales libres pueden actuar como segundos mensajeros. Todos ellos activan una forma citoplasmática del factor de transcripción NF- κ B, al eliminar una subunidad proteica inhibidora, I κ B. Este factor de transcripción regula gran variedad de genes relacionados con la inmunidad, la inflamación y el cáncer. La activación del NF- κ B se inhibe por agentes que eliminan moléculas oxidantes y puede recuperarse mediante una exposición a un débil estrés oxidativo. Por tanto, una situación que genere estrés oxidativo, como la que se da durante el ejercicio físico, aumenta la actividad NF- κ B debido a la activación de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), y facilita la respuesta regenerativa post ejercicio (Kramer y Goodyear 2007).

Desde los años 90 varios estudios apuntan que una pequeña cantidad de oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno, juegan un papel crucial como segundo mensajero en la transducción de la señal para la activación, diferenciación y proliferación celular (Schreck, Albermann y cols. 1992). Por tanto, la inducción o inhibición de la proliferación celular parece depender de los niveles de oxidantes/antioxidantes dentro de la célula. Un ambiente reducido estimula la proliferación, sin embargo cambios hacia un ambiente más oxidado induce

apoptosis o necrosis celular. En líneas generales, un estímulo oxidante puede actuar como mensajero para la proliferación celular, mientras que si este estímulo es muy intenso puede inducir apoptosis o necrosis celular (Figura 11).

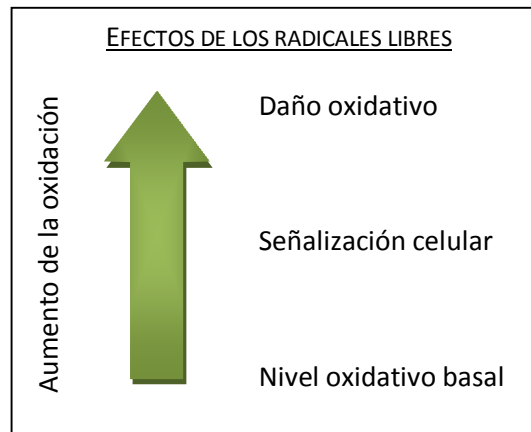


Figura 11. Efectos de los radicales libres en la célula.

Adaptado de Powers y Jackson (Powers y Jackson 2008).

Está demostrado que son necesarios unos niveles bajos de EROs para una producción de fuerza muscular normal (Reid 2001; Supinski y Callahan 2007). Si conseguimos una depleción total de radicales libres en el músculo, mediante el uso de antioxidantes, este es incapaz de producir la máxima fuerza (Coombes, Rowell y cols. 2002; Reid, Khawli y cols. 1993). Por el contrario, un incremento grande de radicales libres en el músculo contribuye a la fatiga muscular durante el ejercicio. La gran mayoría de los estudios concuerdan en que la acción de antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos retrasan la fatiga muscular durante ejercicios submáximos (Anzueto, Andrade y cols. 1992; Barclay y Hansel 1991; Khawli y Reid 1994; Moopanar y Allen 2005; Reid, Haack y cols. 1992; Supinski y Callahan 2007), aunque este efecto no se da si el ejercicio es máximo (Matuszczak, Farid y cols. 2005; Reid, Haack y cols. 1992). Debido a esto, la suplementación con una dosis alta de antioxidantes no mejora el rendimiento en ejercicios de resistencia (Avery, Kaiser y cols. 2003; Bryant, Ryder y cols. 2003; Gaeini, Rahnema y cols. 2006; Powers, DeRuisseau y cols. 2004), pudiendo además interferir en las funciones fisiológicas de las EROs. Sin embargo, existen estudios en los que una ligera suplementación antioxidante, previene el daño muscular y el daño oxidativo, sin bloquear la adaptación celular (Funes, Carrera-Quintanar y cols. 2010).

El fenómeno que explica las diferentes respuestas celulares descritas a un mismo estímulo es la respuesta adaptativa. Esta es el fenómeno celular por el que la exposición a un agente tóxico (en concentraciones subletales) provoca una respuesta celular que protegerá a

Esfuerzo físico agudo, estrés oxidativo y melatonina

la célula contra los efectos adversos de ese tóxico a concentraciones letales. Este es el caso en las agresiones por estrés oxidativo. Se ha comprobado que la exposición a bajos niveles de radiación o a oxígeno hiperbárico aumentan las defensas antioxidantes. El tratamiento con oxígeno al 100% a 2,5 atmósferas, por ejemplo, induce cambios en el daño oxidativo al ADN en las células sanguíneas, pero luego el daño se estabiliza y las defensas antioxidantes suben (García Morales 2007).

MELATONINA Y EJERCICIO FÍSICO

EJERCICIO FÍSICO Y SECRECIÓN ENDÓGENA DE MELATONINA

La melatonina es una molécula de al menos dos mil millones de años (Macías, Rodríguez-Cabezas y cols. 1999; Poeggeler y Hardeland 1994), que está presente en todos los animales y plantas donde se ha buscado, con la misma estructura molecular, situación que muy rara vez sucede en la naturaleza. Se cree que la melatonina apareció con la misión fundamental de “neutralizar el efecto dañino del oxígeno” como productor de radicales libres, poseyendo un potente efecto antioxidante. Con el transcurso del tiempo ha sido capaz de ir adquiriendo otras funciones propias de una hormona. Aunque fueron estas funciones de hormona: regulación de ritmos circadianos, como el sueño vigilia o el de la temperatura corporal, las primeras en estudiarse (Badia, Myers y cols. 1993; Saarela y Reiter 1994).

La secreción de melatonina varía a lo largo de la vida. Durante los primeros seis meses de vida, los niveles nocturnos de melatonina son bajos, siendo entre los 1 a 3 años cuando se alcanzan los picos nocturnos más elevados y con ritmicidad circadiana. Entre los 15 y 20 años ocurre una caída en los niveles del 80 % debida probablemente al incremento de la talla del cuerpo, a pesar de la producción constante de melatonina después de la infancia. Durante las décadas siguientes disminuyen moderada y progresivamente hasta los 70-90 años, en que sus niveles son los más bajos (Waldhauser, Kovacs y cols. 1998).

Como ya se ha mencionado, la noradrenalina está relacionada con la inhibición de la síntesis de esta molécula. Durante el ejercicio físico aumenta la secreción de catecolaminas, tanto por el predominio de la estimulación del sistema nervioso simpático como por la secreción desde la glándula suprarrenal, por lo que se podía presumir que estas inhibieran la producción de melatonina. Sin embargo se ha demostrado que los niveles plasmáticos de melatonina tras el ejercicio no siguen un patrón uniforme.

Se ha medido la concentración plasmática de melatonina antes y después de un ejercicio realizado durante las horas diurnas y se han encontrado incrementos de hasta el 200% en la concentración plasmática de melatonina tras un ejercicio agudo, aunque esta concentración desciende hasta un nivel basal rápidamente, entre 30 minutos y una hora después (Carr, Reppert y cols. 1981). Si el ejercicio se realiza en una cámara con escasa iluminación, los aumentos en la melatonina plasmática se producen de manera similar, aunque

los efectos son más duraderos, tardando alrededor de una hora en volver a una concentración basal (Theron, Oosthuizen y cols. 1984). Si se añade que el ejercicio se realiza en una cámara completamente oscura, los incrementos son aún mayores.

Pero cuando los ejercicios son realizados durante las horas nocturnas, no se produce ninguna variación, por lo que se demuestra que la activación simpática y la liberación de cortisol debidas al ejercicio no influyen en la secreción nocturna de la glándula pineal (Monteleone, Fuschino y cols. 1992; Monteleone, Maj y cols. 1990). Después del ejercicio la cantidad de melatonina en la glándula pineal disminuye y no se observan cambios en la actividad enzimática que interviene en su producción (Yaga, Tan y cols. 1993).

Esta variedad de respuestas puede explicarse debido a los cambios en la iluminación y la hora en que se realizó el ejercicio, además de las diferencias interindividuales respecto al nivel físico de los sujetos. La liberación es dependiente, aparte de estos factores, de la edad (Appenzeller y Wood 1992) y del tipo de ejercicio. Intensidades bajas, en torno al 40% - 60% del VO_2 máx., no influyen en los niveles de melatonina; pero intensidades de más del 75% del VO_2 máx., sí que producen aumentos (Buxton, L'Hermite-Baleriaux y cols. 1997). Los ejercicios intensos y prolongados en el tiempo producen un incremento inmediato tras el ejercicio (Serrano, Venegas y cols. 2010), regulando el incremento del estrés oxidativo y previniendo la inducción exagerada de citoquinas proinflamatorias, aunque este incremento es cada vez menor tras cada uno de los días de ejercicio (Lucia, Diaz y cols. 2001). Es decir, la actividad basal de la glándula pineal disminuye tras un ejercicio intenso y duradero en el tiempo. Esto unido al incremento de la actividad antioxidante sugiere una adaptación de otros sistemas de defensa frente al estrés oxidativo.

Podemos afirmar pues que el ejercicio influye en la secreción de melatonina dependiendo a su vez del tiempo e intensidad del esfuerzo, de la exposición a la luz y de la hora en que se realiza.

EJERCICIO FÍSICO Y ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE MELATONINA

La melatonina tiene muchos efectos sobre la fisiología humana. En la actualidad la melatonina es habitualmente consumida en algunos países para los problemas de insomnio, para el jet-lag y en ocasiones para ralentizar el envejecimiento. En Europa, la melatonina está registrada por la Agencia Europea del Medicamento como Circadin®, medicamento con indicación en el insomnio primario. En dosis inferiores a 2 mg también hay especialidades

registradas como suplemento dietético en la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, sin embargo en otros países se puede adquirir a cualquier dosis como suplemento alimenticio en tiendas de dietética.

La melatonina posee importantes efectos relacionados con el rendimiento, como son las propiedades hipotérmicas (Atkinson, Drust y cols. 2003), la mejor utilización de sustratos energéticos como el glucógeno (Mazepa, Cuevas y cols. 2000) y la disminución de los marcadores de inflamación y de estrés oxidativo, gracias a su gran capacidad antioxidante (Ochoa, Diaz-Castro y cols. 2011). De todos ellos, quizá el más estudiado haya sido la influencia en la temperatura corporal. El calor reduce la viscosidad muscular haciendo que la resistencia de las fibras al movimiento sea menor (Racinais y Oksa), sin embargo, el descenso de la temperatura no tiene porqué provocar una disminución en el rendimiento físico. En ejercicios de resistencia, un descenso en la temperatura de las extremidades inferiores en ambientes cálidos puede mejorar el rendimiento deportivo (Bishop 2003) y reducir el tiempo de fatiga (Thornley, Maxwell y cols. 2003).

1. EFECTOS EN LA TEMPERATURA CORPORAL

La regulación de la temperatura corporal depende de la capacidad del sistema nervioso de percibir e integrar la información tanto de la temperatura exterior como de la temperatura central del cuerpo (Boulant 1998). Esta integración se completa con la información del centro regulador de la temperatura, localizado en el hipotálamo (Fortney y Vroman 1985). El núcleo supraquiasmático participa en la variación circadiana de la temperatura corporal por lo que se cree que está mediado por la secreción de melatonina por la glándula pineal (Hofman y Swaab 1993), dada la proximidad anatómica de ambos centros de control. Aunque puede que haya otros factores que influyan en esta regulación debido a que los picos máximo y mínimo de melatonina y temperatura no coinciden exactamente sino que aparecen en momentos muy próximos.

Independientemente de la relación entre ambas variaciones circadianas, la melatonina tiene efecto en los sistemas de termorregulación tanto en humanos como en animales (Badia, Myers y cols. 1993; Dawson y van den Heuvel 1998). Existe una relación entre la administración exógena de melatonina y su efecto hipotérmico, como en situaciones en las que se ha controlado la actividad física, la postura y la iluminación de los sujetos (Cagnacci, Soldani y cols. 1994; Dawson, Gibbon y cols. 1996; Gilbert, van den Heuvel y cols. 1999; Nave, Herer y cols. 1996). Este efecto hipotérmico es independiente del sexo, ya que se han descrito

variaciones en la temperatura corporal tanto en hombres como en mujeres, independientemente de que el lugar de medición sea oral (Aizawa, Tokura y cols. 2002), timpánica (Aizawa, Tokura y cols. 2002; Hughes y Badia 1997), rectal (Satoh y Mishima 2001; Strassman, Qualls y cols. 1991) o intravaginal (Cagnacci, Elliott y cols. 1992), lo que refuerza que el cambio sea debido a causas fisiológicas más que a diferencias metodológicas.

Se ha comprobado que la melatonina exógena restituye el descenso de la temperatura nocturna, cuando la secreción de melatonina endógena ha sido inhibida mediante la administración de atenolol (Cagnacci, Soldani y cols. 1994), ya que si la inhibición no es completa, no aparecen efectos en la temperatura, por lo que la acción hipotérmica de esta hormona sería independiente de la dosis y su respuesta sólo dependería del umbral fisiológico. Otros estudios, sin embargo, sugieren que el efecto es dosis dependiente (Dawson, Gibbon y cols. 1996; Deacon y Arendt 1995; Hughes y Badia 1997; Satoh y Mishima 2001), aunque todos estos cambios pueden explicarse por la variabilidad interindividual para alcanzar los niveles fisiológicos de melatonina.

Como ya hemos mencionado, los receptores de melatonina se encuentran tanto en el SNC como en órganos periféricos, por lo que puede ejercer su efecto tanto sobre los centros termorreguladores del cerebro como en los mecanismos periféricos que controlan la producción/pérdida de calor (Cagnacci, Krauchi y cols. 1997).

2. MELATONINA Y RENDIMIENTO

Hay variedad de situaciones fisiológicas en las que la acción hipotérmica de la melatonina está alterada, como por ejemplo, la edad (Cagnacci, Soldani y cols. 1995; Weinert y Waterhouse 2007) y la fase del ciclo menstrual (Baker, Waner y cols. 2001; Cagnacci, Soldani y cols. 1996). Otra causa de alteración del efecto en la temperatura es el ejercicio. Los posibles efectos ergogénicos de esta indolamina han sido poco estudiados, aunque con los antecedentes en la bibliografía sobre su efecto hipotérmico, antiinflamatorio y antioxidante, es una sustancia que potencialmente puede producir una mejora en el rendimiento. El ejercicio físico intenso puede estar limitado por un aumento de la temperatura central, así como por el estrés oxidativo generado (Gonzalez-Alonso, Teller y cols. 1999; Walters, Ryan y cols. 2000). Al administrar una dosis de melatonina antes del ejercicio, se consigue atenuar el incremento de la temperatura corporal (Atkinson, Holder y cols. 2005) y posiblemente atenuar el daño oxidativo.

El papel de esta indolamina como antioxidante durante el ejercicio no ha sido muy estudiado, aunque se ha hallado que en músculo esquelético disminuye la concentración de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, como el MDA + 4HDA, lo que supone un descenso del daño a lípidos provocado por un aumento del estrés oxidativo. A su vez, disminuye la activación del NF-κB mediado por radicales libres y la sobreexpresión de la iNOS, relacionada con la inflamación muscular post-ejercicio (Alonso, Collado y cols. 2006). En tejido cardiaco, se han descrito resultados similares. La administración de melatonina preejercicio previene el daño cardiaco debido a éste, además de disminuir la activación del NF-κB, iNOS, COX2 y los niveles de interleucinas 2 y 6 (Veneroso, Tunon y cols. 2009). Otros factores relacionados con la inmunidad, con el factor tisular o aumento de linfocitos tras el ejercicio también se ven reducidos tras la ingestión de melatonina (Johe y Osterud 2005). La medición del factor tisular, el número de leucocitos y las interleucinas 2 y 6, relacionado todo con la inmunidad, nos lleva a pensar en que el papel regulador de la melatonina en esta función puede ser interesante asociado al ejercicio. Todo ello conlleva una disminución de los mediadores de inflamación y en consecuencia se reduce el daño debido al ejercicio intenso agudo, como sucedía en el músculo esquelético. Sin embargo, como ya habíamos comentado, estos factores de transcripción pueden influir en la adaptación muscular al ejercicio, con lo que el efecto del ejercicio quedaría disminuido por la administración de este antioxidante. Si el nivel de esfuerzo no es muy alto, los radicales libres que mediarían la adaptación quedarían detoxificados por la melatonina. Sin embargo, en esfuerzos máximos, la administración de melatonina podría atenuar el daño ocasionado por el exceso de radicales libres generados durante el ejercicio.

En ratas, se había demostrado que la inyección de melatonina, tanto en horas de luz como de oscuridad, disminuía el nivel de actividad en la rueda de correr, es decir su rendimiento. Según este estudio, la disminución en su actividad podría no deberse a un efecto sobre la capacidad física del animal sino a que su actitud hacia el ejercicio disminuyera debido a un déficit en la atención inducido por la melatonina (Isobe, Torri y cols. 2002).

Uno de los principales usos que tiene esta hormona es el de regulador del sueño. Este uso no influye en el rendimiento de los deportistas al día siguiente de la toma, por lo que puede ayudar a estos a tener un mejor descanso previo a la prueba sin efectos secundarios en la misma. Así mismo, su papel ante la inflamación puede ser útil durante competiciones favoreciendo la recuperación muscular aunque no durante las épocas de entrenamiento ya que limitaría la adaptación muscular.

Por otro lado, también hay estudios que siembran dudas acerca de la capacidad ergogénica de la melatonina. Si en personas tratamos los efectos de los ejercicios de una duración de menos de 10 minutos, como podrían ser los de coordinación o de fuerza, en los que se ha producido una ingesta de melatonina previa al ejercicio, no se ha encontrado una mejora del rendimiento ni en la percepción subjetiva de esfuerzo. Por el contrario sí que se ha producido un descenso en el nivel de atención de los sujetos así como en memoria a corto plazo (Atkinson, Jones y cols. 2005). Estudios anteriores habían descrito hallazgos similares tras la ingestión de melatonina tanto en dosis altas (240 mg) (Lieberman, Waldhauser y cols. 1984), como en dosis menores (10-80 mg) (Dollins, Lynch y cols. 1993). En ambos estudios se administra melatonina por vía oral en una hora cercana al mediodía antes de realizar un ejercicio físico corto y no se observa alteración alguna en el nivel de rendimiento, sino que por el contrario se produjo un descenso en el tiempo de reacción. Para cualidades del rendimiento en las que interviene la percepción, como en la propiocepción y el equilibrio, la melatonina produce una pérdida de capacidad para mantener el equilibrio, aunque estos efectos son a corto plazo y pasajeros (Fraschini, Cesarani y cols. 1999). Esta característica fue comprobada mediante la administración oral de melatonina antes del sueño y la posterior medición del tiempo necesario para pedalear 4 km sobre un cicloergómetro y la fuerza de compresión de ambas manos, observándose que el rendimiento en las pruebas no se veía afectado. Por otro lado, este estudio apunta a que los atletas con alteraciones del sueño tuvieron un mejor descanso debido a la melatonina (Atkinson, Buckley y cols. 2001).

Los ejercicios de fuerza son otro estímulo de corta duración con implicaciones fisiológicas en el rendimiento diferentes a las que tienen los ejercicios de resistencia o coordinación. Se ha estudiado la respuesta a una serie de ejercicios de fuerza tras la ingestión de 6 mg de melatonina. Parece que esta no tiene ningún efecto sobre la capacidad de salto o el peso levantado en el "press banca" (Mero, Vahalamukka y cols. 2006), lo que supone que la melatonina tampoco incrementa el rendimiento deportivo en ejercicios de fuerza.

A pesar de estos estudios, hay varios otros que aportan datos para clarificar su posible rol en la mejora del rendimiento físico. Mazepa y cols. (2000) observaron la capacidad de la melatonina, administrada de manera exógena para conservar los depósitos de glucógeno hepático y muscular. Durante un ejercicio extenuante, los animales tratados con melatonina conservaron mejor sus reservas de glucógeno, posiblemente modulando el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos. Además la inyección de melatonina reduce los niveles de lactato sanguíneo durante y tras un ejercicio (Kaya, Gokdemir y cols. 2006), lo que sugiere una mejora

en la eficiencia energética de la mitocondria. Estas adaptaciones, podrían producir una mejora en el rendimiento gracias a que se alcanzaría el agotamiento más tarde.

JUSTIFICACIÓN



La expresión del ataque por radicales libres a los fosfolípidos de la membrana celular es el fenómeno de la peroxidación lipídica. Este proceso se inicia con la pérdida de átomos de hidrógeno de los restos acilo de los fosfolípidos y la formación de radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y alcóxido ($\text{RO}\cdot$), lipidoperóxidos, endoperóxidos e hidroperóxidos. A su vez estos nuevos productos inician una reacción en cadena al lesionar a los fosfolípidos vecinos, propagando por toda la membrana la peroxidación lipídica, proceso que una vez iniciado sólo puede detenerse por el agotamiento del sustrato lipídico o la presencia de moléculas antioxidantes (Gutteridge 1995). La peroxidación de los lípidos de la membrana celular tiene como consecuencia la disminución de fluidez en la membrana, que requiere un estado fluido para su funcionamiento correcto.

Es un hecho bien conocido que la práctica de ejercicio físico aumenta las necesidades metabólicas del organismo y, por ello, incrementa el consumo de oxígeno en la mitocondria hasta 25 veces respecto al reposo. Dillard y col (1978), demostraron por primera vez, que el ejercicio físico aumentaba la peroxidación lipídica de las membranas celulares. Desde entonces, numerosos estudios (Bloomer, Falvo y cols. 2006; Cazzola, Russo-Volpe y cols. 2003; Elosua, Molina y cols. 2003; Groussard, Rannou-Bekono y cols. 2003; Radak, Naito y cols. 2002) confirman esta teoría observando un aumento de los valores en sangre de los marcadores del daño oxidativo a lípidos, proteínas, ADN e hidratos de carbono.

Por otro lado, está ampliamente acreditado que el ejercicio físico es un componente vital en el mantenimiento de la salud y retarda el comienzo o previene la aparición de enfermedades crónicas. Los beneficios del ejercicio parecen paradójicos considerando el aumento de la producción de radicales libres que genera. Recientemente algunos investigadores han publicado artículos donde estudian esta relación paradójica, argumentan que la ausencia de unos mecanismos adaptativos o compensatorios al aumento del daño oxidativo producido durante el ejercicio, determina daño al DNA, proteínas y lípidos (Gomez-Cabrera, Domenech y cols. 2008; Radak, Atalay y cols. 2008). Durante otra investigación, Radak y cols. encontraron que el ejercicio regular, concretamente nueve semanas de entrenamiento nadando, previene la disminución GSH/GSSG asociado a la edad (Radak, Chung y cols. 2004). Son numerosos los estudios que orientan a la posibilidad de una mayor tolerancia al estrés oxidativo mediada por el entrenamiento (Gago-Dominguez, Jiang y cols. 2007; Green, Maiorana y cols. 2004; Kaczor, Hall y cols. 2007; Miyazaki, Oh-ishi y cols. 2001; Oztasan, Taysi y cols. 2004; Powers, Ji y cols. 1999).

Esta mayor tolerancia al estrés oxidativo viene dada por un aumento de la actividad

antioxidante del plasma (Child, Wilkinson y cols. 1998). Sin embargo, la actividad antioxidante se define en función de una serie de sistemas antioxidantes que actúan en su conjunto. Existen antioxidantes tanto enzimáticos, como por ejemplo la superóxido dismutasa (Fridovich 1995), la catalasa (Halliwell y Gutteridge 1990), la glutatión peroxidasa o la glutatión reductasa (Meister y Anderson 1983), como no enzimáticos, como las vitaminas C y E, el glutatión, tioredoxina, ácido úrico o la melatonina (Finaud, Lac y cols. 2006).

Por un lado, el ejercicio físico aumenta los procesos oxidativos, lo que precisa de unas defensas antioxidantes que protejan frente a los potenciales daños del aumento del estrés oxidativo. Por otro lado, el ejercicio aeróbico por sí mismo induce una activación de la funcionalidad enzimática oxidativa, potenciando las defensas antioxidantes.

Uno de los factores que más incide en el rendimiento deportivo es la capacidad ergogénica del deportista, es decir, la capacidad de generar energía y, por tanto, retrasar la aparición de la fatiga. Estos procesos están íntimamente ligados a la funcionalidad energética mitocondrial, y por tanto al mantenimiento estructural de sus membranas, especialmente sensibles a los efectos de los radicales libres sobre sus componentes lipídicos. Las respuestas oxidativas que se producen durante el ejercicio intenso y prolongado, como sucede en la mayoría de las competiciones deportivas, tienen un efecto deletéreo sobre la capacidad ergogénica, acelerando los procesos metabólicos que conducen a la fatiga muscular.

Sobre la base de estas evidencias se concluye que para que el entrenamiento físico consiga mejorar las variables que determinan el rendimiento deportivo, como la fuerza y la velocidad, es necesario planificar la estimulación de aquellos procesos bioquímicos, como los oxidativos, que pueden contribuir a mejorar la asimilación de las cargas de entrenamiento, o por el contrario, cuando no se controlan adecuadamente, pueden incrementar los riesgos asociados a la fatiga. En este sentido, la estimulación del equilibrio entre procesos oxidativos y capacidad antioxidante mediante el manejo de las cargas de trabajo, provocando distintas respuestas oxidativas, y del ajuste de la dieta y los suplementos nutricionales, son un claro ejemplo de la necesidad de profundizar en las respuestas bioquímicas al ejercicio como medio ideal para mejorar el rendimiento deportivo.

Además de mejorar el rendimiento deportivo, hay que tener en cuenta que la práctica regular de ejercicio físico es una de las recomendaciones más difundidas como medio de promocionar la salud y prevenir muchas de las patologías más prevalentes en nuestro entorno. Sin embargo, dadas las distintas respuestas oxidativas que se producen durante dicha práctica dependiendo de la modificación de las diferentes variables que definen el ejercicio físico, se

hace necesario conocer los principales mecanismos de oxidación así como las manipulaciones alimentarias y de entrenamiento físico que puedan evitar las repercusiones negativas que el estrés oxidativo pueda desencadenar sobre las estructuras celulares implicadas en estos procesos. En este sentido, la melatonina presenta un perfil funcional protector frente a potenciales riesgos oxidativos ligados al ejercicio intenso que puede hacer atractiva su utilización en el deporte, teniendo en cuenta la ausencia de efectos secundarios negativos de esta sustancia.

Este trabajo de investigación se diseñó para profundizar sistemáticamente en el conocimiento del daño oxidativo producido durante el ejercicio agudo y la prevención de éste, y por lo tanto, la acción ergogénica de los antioxidantes.

En primer lugar se estudió, en voluntarios sanos que realizaron diferentes protocolos de ejercicio máximos y submáximos, la producción de radicales libres y como consecuencia de ésta, la disminución o pérdida de fluidez en la membrana del eritrocito y la aparición de metabolitos derivados del daño a lípidos y a proteínas. Para ello se analizaron los marcadores de estrés oxidativo, MDA+4-HDA y restos carbonilo séricos y, por otro lado, la fluidez de membrana eritrocitaria. Esto nos permitió establecer qué respuesta producía el ejercicio físico a diferentes intensidades.

En una segunda fase de estudio, se determinaron los cambios en la actividad antioxidante total (TAS) en el plasma y la actividad de cuatro enzimas antioxidantes diferentes. De este modo, se comprobó si los antioxidantes enzimáticos colaboraban en estas modificaciones del TAS. Así, el conjunto del daño oxidativo y las actividades antioxidantes permitieron tener una visión global del estrés oxidativo producido en diferentes tipos de ejercicio.

En último lugar, se evaluó si la función antioxidante de la melatonina supuso una ayuda ergogénica en el ejercicio físico agudo, sometiendo a dos grupos de ratas a un ejercicio progresivo y extenuante. A uno de los dos grupos se le inyectaron cuatro dosis de melatonina: 24, 16, 8 horas y justo antes de realizar el ejercicio, mientras que a los otros se les inyectó sólo el vehículo. Así se comprobó cómo afecta este compuesto al rendimiento tras un ejercicio máximo agudo.

OBJETIVOS

1. Determinar en voluntarios sanos, tras la realización de diferentes modalidades de ejercicio físico, la concentración de MDA+4-HDA como indicador del daño provocado por radicales libres a lípidos y analizar el daño oxidativo a proteínas plasmáticas cuantificando restos carbonilo.
2. Estudiar la evolución de la actividad total antioxidante en plasma, buscando relaciones con los niveles de MDA+4-HDA y restos carbonilo.
3. Describir los efectos del ejercicio físico sobre la fluidez de membrana eritrocitaria relacionando los cambios con indicadores plasmáticos de daño oxidativo a lípidos y proteínas.
4. Cuantificar la actividad sérica de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y reductasa, y buscar relaciones con la actividad total antioxidante y la formación de MDA+4-HDA y restos carbonilo.
5. Valorar el rendimiento físico en ratas *Sprague-Dawley* determinando distancia recorrida, tiempo, velocidad máxima, así como consumo máximo de oxígeno tras realizar ejercicio físico extenuante.
6. En ratas tratadas con melatonina intraperitoneal, estudiar el rendimiento físico tras ejercicios extenuantes comparando los resultados con los obtenidos en el grupo sin melatonina.

MATERIAL Y MÉTODOS

SUJETOS

Un total de 34 voluntarios varones sanos no entrenados de 19-29 años ($23 \pm 0,41$) participaron en este estudio. Sólo se incluyeron varones para evitar cualquier distorsión en la respuesta hormonal al ejercicio causada por diferencias de sexo (Bloomer y Fisher-Wellman 2008). Ninguno de ellos participaban regularmente en una competición deportiva y no realizaron ningún tipo de ejercicio intenso ni tomaron medicación en las 24 horas anteriores a las pruebas. Todos los sujetos se sometieron a un reconocimiento médico que incluyó la historia clínica, examen físico, electrocardiograma y perfil bioquímico para descartar posibles patologías. Todos firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio, que fue diseñado siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki (Figura 12).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Datos del participante
 D/Dª:
 DNI:

Explicación de la prueba
 Usted realizará tres pruebas de esfuerzo sobre un cicloergómetro. En todas la intensidad del ejercicio empezará a un nivel bajo e irá aumentando progresivamente según sea su nivel de fitness. Podemos detener la prueba en cualquier momento si hay signos de fatiga o cambios en su frecuencia cardíaca, en el electrocardiograma o en la tensión arterial. Es importante que sepa que puede parar cuando lo desee, cuando sienta fatiga u otra molestia. Se realizará a su vez una extracción sanguínea basal y postesfuerzo después de cada una de las pruebas de esfuerzo, se llevaran a cabo a nivel del antebrazo.

Riesgos y molestias que implica la prueba
 Existe la posibilidad de que se produzcan ciertos cambios durante la prueba entre los que se incluyen alteración de la tensión arterial, desmayos, frecuencia cardíaca irregular, rápida o lenta, apoplejía o muerte. Se harán todos los esfuerzos posibles para minimizar estos riesgos mediante la evaluación de la información preliminar concerniente a su salud y fitness, y mediante las observaciones que se hagan durante la prueba. Se dispone de material de urgencia, así como de personal preparado para actuar en cualquier situación inusual que pueda surgir.

Responsabilidades del participante
 La información que usted posea sobre su estado de salud o sobre experiencias previas en las que tuvo sensaciones anormales al realizar un esfuerzo físico puede afectar la seguridad o el valor de la prueba de esfuerzo. La rápida comunicación por su parte de las sensaciones que experimenta al realizar esfuerzos durante dicha prueba es también de gran importancia. Usted es responsable de revelar esa información al personal de la prueba cuando se le pregunte.

Beneficios esperados
 Los resultados que se obtengan de la prueba de esfuerzo pueden ayudar a diagnosticar su malestar o a evaluar qué clase de actividad física puede hacer con bajo riesgo.

Preguntas
 Le animamos a que haga cualquier pregunta sobre los procedimientos seguidos en la prueba de esfuerzo o sus resultados en la prueba. Si tiene alguna preocupación o pregunta, por favor pídanos más información.

Libertad para dar el consentimiento
 El permiso que usted da para realizar esta prueba de esfuerzo es voluntario. Es usted libre de parar la prueba en cualquier punto de ella si lo desea.

He leído este formulario y entiendo los procedimientos de la prueba que voy a realizar y sus posibles riesgos y molestias. Sabiendo esto y habiéndome dado la oportunidad de plantear preguntas que han sido contestadas satisfactoriamente, doy mi consentimiento para participar en esta prueba.

En Zaragoza,dede 2006

Firma participante Firma testigo Firma médico o delegado autorizado

Figura 12. Consentimiento informado firmado por los participantes

ANIMALES

En la tercera fase del estudio, se utilizaron tres grupos de ratas de la raza Sprague-Dawley, con un peso medio $202,6 \pm 22,7$ g, asignadas al azar. Los animales se encontraban estabulados en jaulas de 20 L, 4 animales en cada jaula. Siguieron una alimentación ad libitum (dieta para mantenimiento de roedores) y libre acceso al agua hasta el día de la prueba. Se mantuvieron a una temperatura constante ($22 \pm 1^\circ$ C) y un ciclo luz-oscuridad 12:12 horas. Se utilizó luz roja durante la manipulación de los animales en oscuridad.

Los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos: grupo control (C), grupo de ejercicio (E) y grupo ejercicio con administración de melatonina (M). El día del experimento, los grupos E y M llevaron a cabo una ergometría en una jaula metabólica adaptada con un tapiz rodante para conocer su $VO_{2\text{máx.}}$, como se ha descrito antes. La melatonina se administró al grupo M intraperitoneal, 24, 16, 8 horas y 30 minutos antes de la prueba. La dosis fue de 10 mg/kg de peso, diluida en una solución salina 0,9% con etanol 0,5%. A las ratas de los grupos C y E se les inyectaron en las mismas horas únicamente el vehículo (igual volumen de solución salina 0,9% y etanol 0,5%)

Todos estos protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (referencia CP02/2010).

CICLOERGOMETRÍAS EN SUJETOS

Los ejercicios se realizaron en un cicloergómetro de freno eléctrico entre las 8:00 y las 10:30 a.m. Todos los participantes pedaleaban con una cadencia de 60 pedaladas por minuto. Las tres pruebas ergométricas se realizaron en cada sujeto en orden aleatorio con intervalos de al menos una semana. Primero se determinó el consumo máximo de oxígeno ($VO_{2\text{máx}}$) y la máxima capacidad de trabajo (MWC) realizando un ejercicio con incremento progresivo de la carga de 10 W cada minuto hasta el agotamiento (Carta, Aru y cols. 1991). El consumo de oxígeno se determinó utilizando un analizador de gases “respiración por respiración”, CPX Express (MedGraphics®). En segundo lugar, todos los sujetos realizaron una prueba con una carga igual a MWC hasta el agotamiento. La carga inicial fue 100W menos que la MWC determinada en la primera ergometría (Caputo y Denadai 2004). Finalmente, todos los voluntarios pedalearon durante 30 minutos a una intensidad submáxima del 70% de MWC (Bloomer, Falvo y cols. 2006).



Figura 13. Realización de una cicloergometría

ERGOMETRÍAS EN ANIMALES

Se realizó una única prueba máxima en la que se valoró el consumo máximo de oxígeno de cada una de las ratas. Esta prueba se realizó durante el ciclo de oscuridad de los animales. Para ello se utilizó un tapiz rodante con una pendiente constante de 10° de inclinación (Figura 14). Los animales fueron sometidos a un periodo de calentamiento previo con una duración de 3 minutos y una velocidad de 0,15 m/s. A continuación se fue incrementando la velocidad del tapiz 0,03 m/s cada 3 minutos. Para medir el oxígeno que consumía la rata, el tapiz se situó en el interior de una cámara metabólica, pudiendo medir los intercambios de gases (Treadmill LE405 de Panlab®). Se determinó el trabajo correspondiente al VO_2 máx cuando el VO_2 dejó de incrementarse o cuando la prueba terminó. Esto vino determinado por la imposibilidad de correr de la rata debido a la fatiga (Wisloff, Helgerud y cols. 2001).

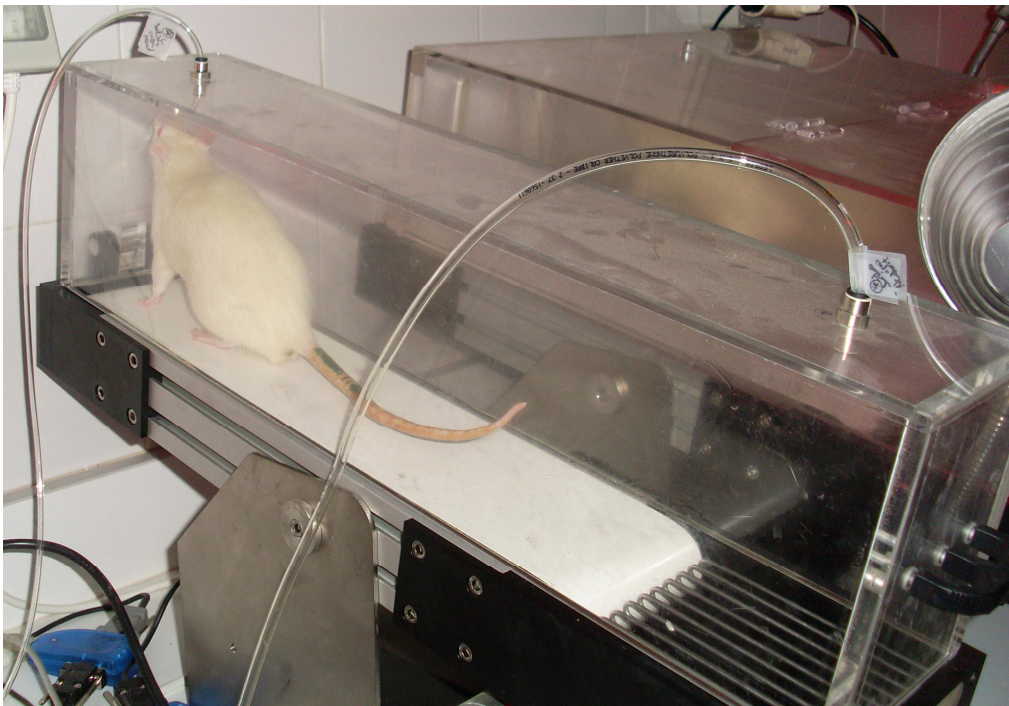


Figura 14. Realización de una ergometría en la cámara metabólica

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Las muestras de sangre venosa periférica se obtuvieron antes del ejercicio (A) e inmediatamente después de realizar un ejercicio máximo progresivo (B), un test mantenido hasta el agotamiento (C) y una prueba submáxima (70% de la carga máxima de trabajo) durante 30 minutos (D) de la vena antecubital y recogida en tubos con heparina de litio. Se tomaron 10 mL de sangre en cada extracción. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente a 1000 xg durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada Beckman Allegra 64R (Fullerton, USA). El plasma se guardó en alícuotas de 250 μ L a -80°C hasta que se determinó el contenido de carbonilos, la concentración de MDA + 4-HDA, el TAS y las actividades enzimáticas. La fase de glóbulos rojos del fondo se lavó 3 veces con 10 mL de solución salina (0,9% NaCl) y fue finalmente disuelto 1/6 p/v en tampón hipotónico TRIS-HCl 10 mM (pH=7,4) y, por ello, hemolizadas para el aislamiento de membranas de eritrocitos.

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS ERITROCITARIAS

El aislamiento de las membranas de eritrocitos se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Hanahan y Ekholm (Hanahan y Ekholm 1974) con modificaciones menores. Resumiendo, el hemolizado de glóbulos rojos se centrifugó a 30.000 x g durante 20 minutos. El pellet se resuspendió 1:5 p/v en tampón TRIS-HCl 10 mM y se lavó dos veces más. El pellet final se resuspendió 1:1 p/v y se guardó a -80°C hasta la determinación de la fluidez de las membranas (Figura 15).

Protocolo

- En primer lugar se centrifuga el hemolizado de sangre a 30.000 xg durante 20', con el fin de que las membranas celulares precipiten al fondo del tubo.
- Retirar el sobrenadante de color rojizo y a continuación resuspender 1/5 p/v todos los tubos con tampón Tris 10 mM.
- Repetir dos veces más este lavado con Tris 10 mM.
- Tras el último lavado, centrifugar a 48.000 xg durante 20' a 4°C

Esfuerzo físico agudo, estrés oxidativo y melatonina

- Resuspender el pellet final 1/1 p/v con el tampón Tris 10 mM. y conservar a -80° C hasta el momento en que se determine la fluidez de las membranas.

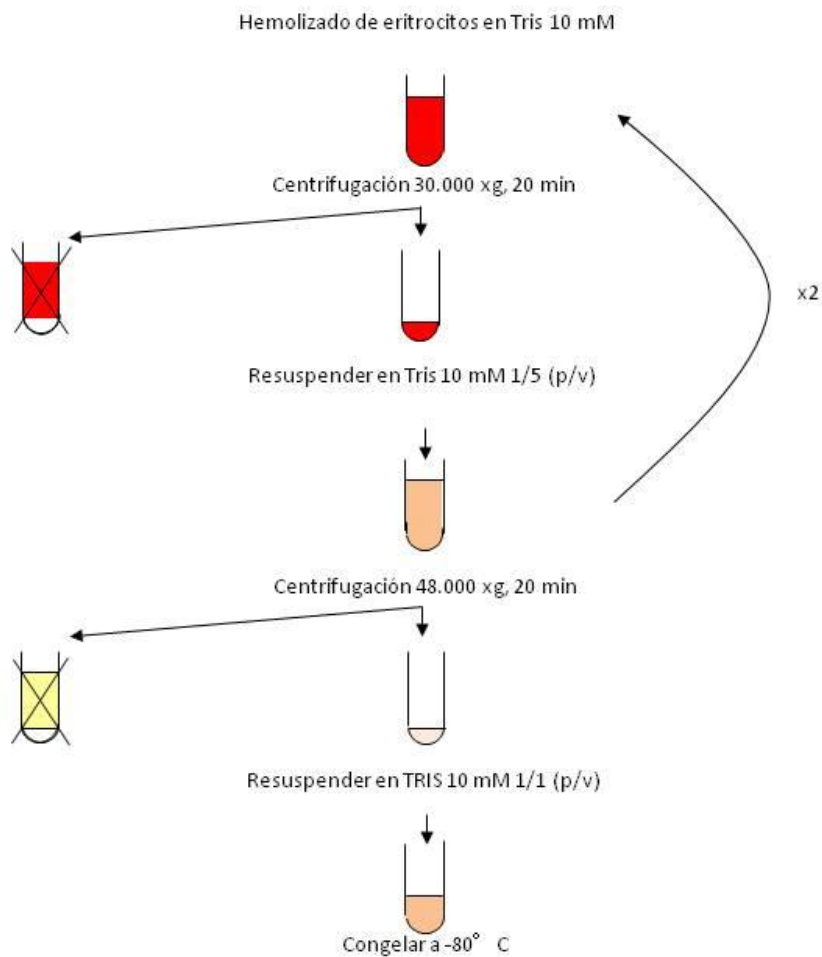


Figura 15. Protocolo de aislamiento de membranas de eritrocitos.

MÉTODOS ANALÍTICOS

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó el método de Bradford (1976) para calcular la concentración de proteínas en las muestras analizadas y utilizarla en los resultados de los indicadores de daño oxidativo que están referidos a la misma. Este método se basa en la reacción entre el azul de Coomassie y los aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina. Esta reacción produce cambios de absorbancia a 595 nm que son directamente proporcionales a la concentración de proteínas (Figura 16).

La concentración de proteínas de la muestra problema se obtuvo interpolando su valor de absorbancia en la curva patrón de albúmina (coeficiente correlación $0,99 \pm 0,01$) y multiplicando posteriormente por el factor de dilución aplicado en cada caso. Los valores de concentración de proteínas se expresan en mg/mL.

Protocolo

- Dispensar 2 alícuotas de 4 μ L de cada una de las muestras problema previamente diluida para que la lectura esté comprendida entre los estándares inferior y superior.
- Añadir a todos los tubos tampón Tris 20 mM hasta completar 800 μ L.
- Dispensar 200 μ L de reactivo de Bradford de Bio-rad® (Azul brillante de Coomassie G-250 al 0,01%, etanol 4.7%, ácido ortofosfórico 8,5%, diluido en agua destilada).
- Agitar e incubar durante 10 min a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. Utilizar como blanco 800 μ L Tris 20 mM y 200 μ L reactivo de Bradford.
- Para construir la recta de calibrado se realizan disoluciones de concentraciones conocidas (0-16 μ g/mL) de seroalbúmina bovina (BSA) en tampón Tris 20 mM.

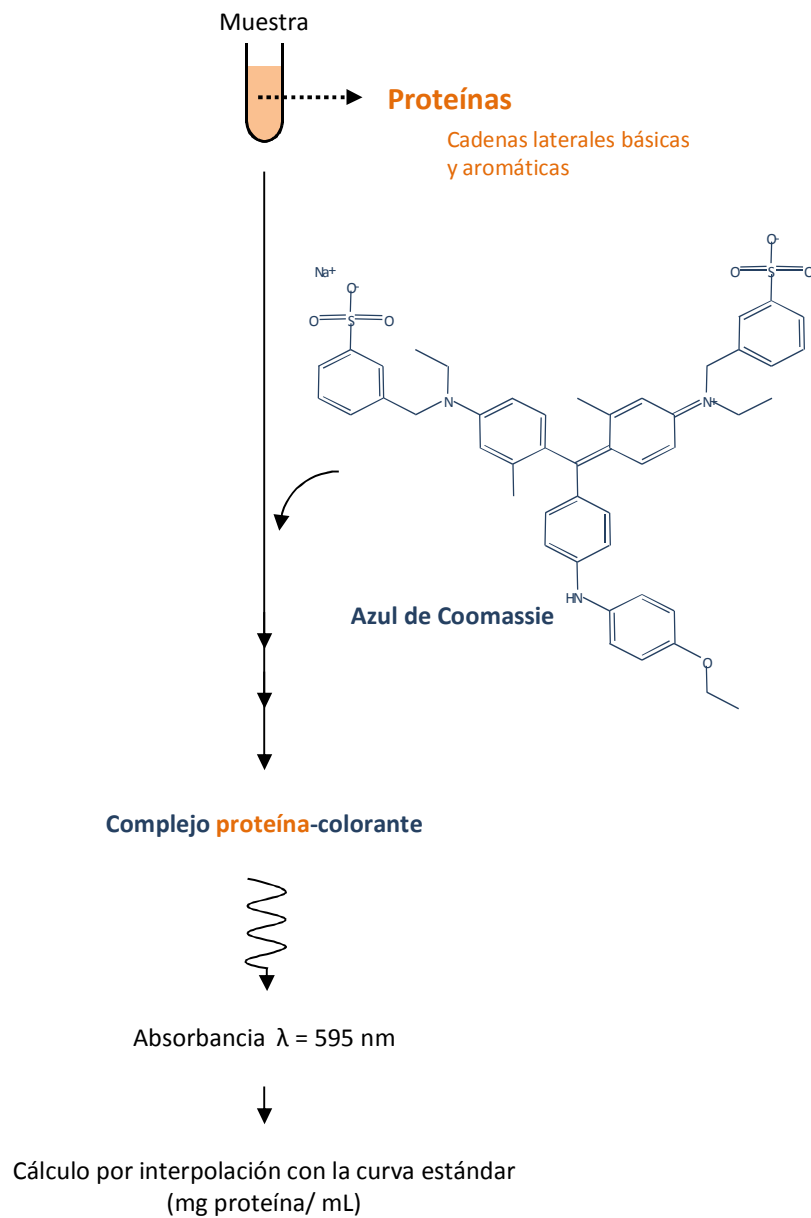


Figura 16. Protocolo de cuantificación de proteínas.

CUANTIFICACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La acción de los radicales libres sobre los lípidos de las membranas celulares tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, provocando su peroxidación. Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica (LPO) son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, siendo mayoritarios el MDA y los 4-HDA. Por lo tanto la concentración de MDA+4-HDA es un indicador del grado de peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas (Janero 1990). La concentración de MDA+4-HDA se determinó por un método colorimétrico (Esterbauer y Cheeseman 1990) basado en la reacción de un reactivo cromógeno, el N-metil-2-fenilindol, con el MDA o con los 4-HDA, a una temperatura de 45°C. La condensación de una molécula de MDA ó 4-HDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico presenta una absorbancia máxima a 586 nm (Figura 17). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Protocolo

- Centrifugar las muestras a 3.000 xg durante 10 minutos a 4°C.
- Dispensar 2 alícuotas de 200 µL del sobrenadante y añadir 650 µL de N-metil-2-fenilindol 10,3 mM disuelto en acetonitrilo, y metanol, en relación 1:3 (v/v).
- Agitar y dispensar 150 µL de ácido metanosulfónico 15,4 M.
- Incubar los tubos durante 40 minutos a 45°C.
- Centrifugar a 3.000 xg durante 10 min a 4°C.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 586 nm en el espectrofotómetro.
- Para obtener la recta de calibrado se utilizaron diluciones de concentración conocida (0-10 µmol/L), a partir de una disolución de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 10 mM en TRIS 20 mM. El 1,1,3,3-tetrametoxipropano, al hidrolizarse libera MDA de forma estequiométrica (Nielsen, Mikkelsen y cols. 1997).

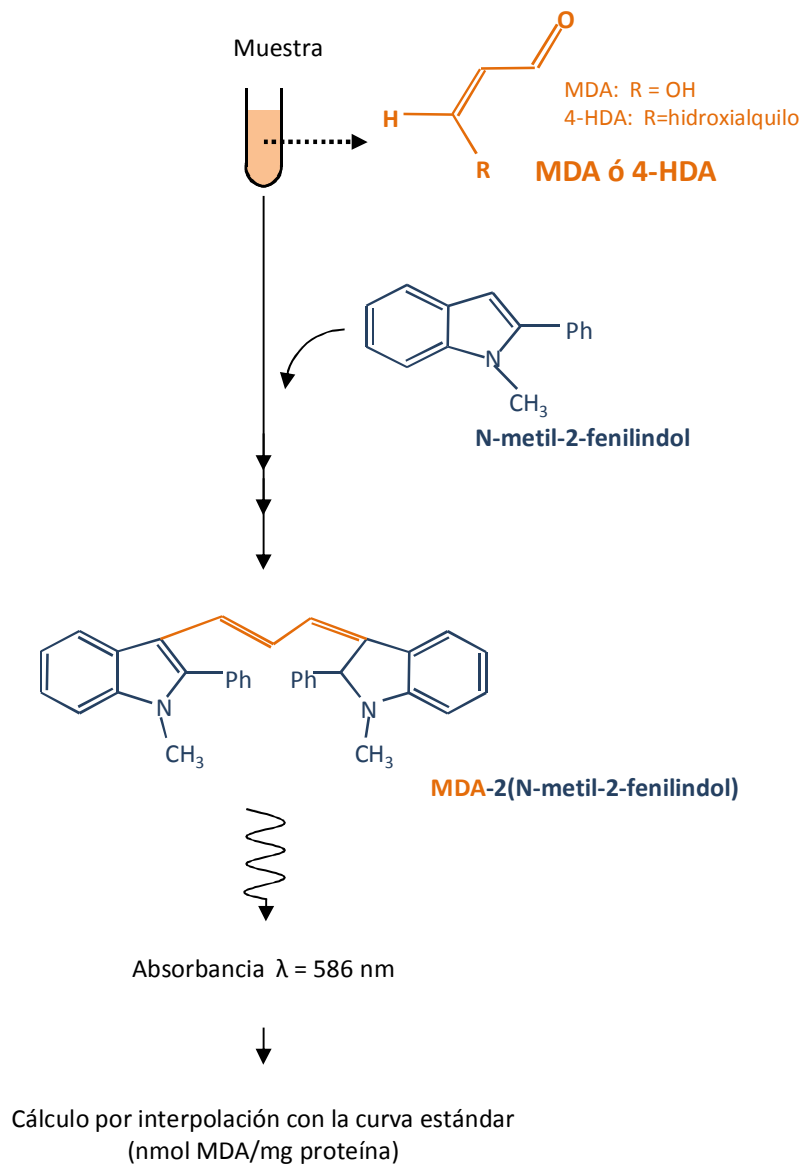


Figura 17. Protocolo de cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiálquenos (4-HDA).

CUANTIFICACIÓN DE RESTOS CARBONILO

Para valorar el daño oxidativo a las proteínas de los homogenizados y de las membranas, se utilizó la determinación de los restos carbonilo de las proteínas (Davies y Goldberg 1987; Dean, Fu y cols. 1997). Para ello se siguió el protocolo descrito por Levine y cols. (Levine, Garland y cols. 1990) con modificaciones mínimas. Este método está basado en la reacción de los restos carbonilo de las proteínas con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formándose un derivado que se cuantifica midiendo su absorbancia en el rango 360-390 nm. Durante el procedimiento se utiliza el ácido tricloroacético (TCA) para la precipitación de las proteínas, los lavados para la eliminación del exceso de DNPH que no ha reaccionado con restos carbonilo, y la guanidina para redissolver las proteínas y poder realizar la lectura en el espectrofotómetro (Figura 18).

A partir de la absorbancia obtenida se calculó la concentración de restos carbonilo empleando la ley de Beer-Lambert y el coeficiente de absorción molar de la DNPH ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Finalmente, tras la determinación de las proteínas totales, los resultados se expresaron en nmol de restos carbonilo / mg de proteínas totales.

Protocolo

- Añadir a 1 mL de las muestras: 100 μL de TRIS 20 mM pH 7,4 y 200 μL de DNPH 10 mM en HCl 2N.
- Agitar e incubar durante 1h a 37°C.
- Dispensar 325 μL TCA 50% frío e incubar en hielo durante 10 min.
- Centrifugar a 3.000 xg 10 min a 4°C.
- Lavar el precipitado 3 veces, resuspendiendo con 1 mL de etanol:acetato de etilo 1:1, v:v y centrifugando a 11.000 xg durante 3 min a 4°C.
- Disolver el precipitado final en 700 μL de guanidina-HCl 6 M pH = 2,00.
- Agitar e incubar, a 37°C durante 15 min.
- Centrifugar a 12.000 xg durante 10 min a 4°C.
- Leer la absorbancia del sobrenadante a 375 nm (lámpara ultravioleta) en cubeta de cuarzo a temperatura ambiente. Utilizar como blanco una disolución de guanidina 6 M.

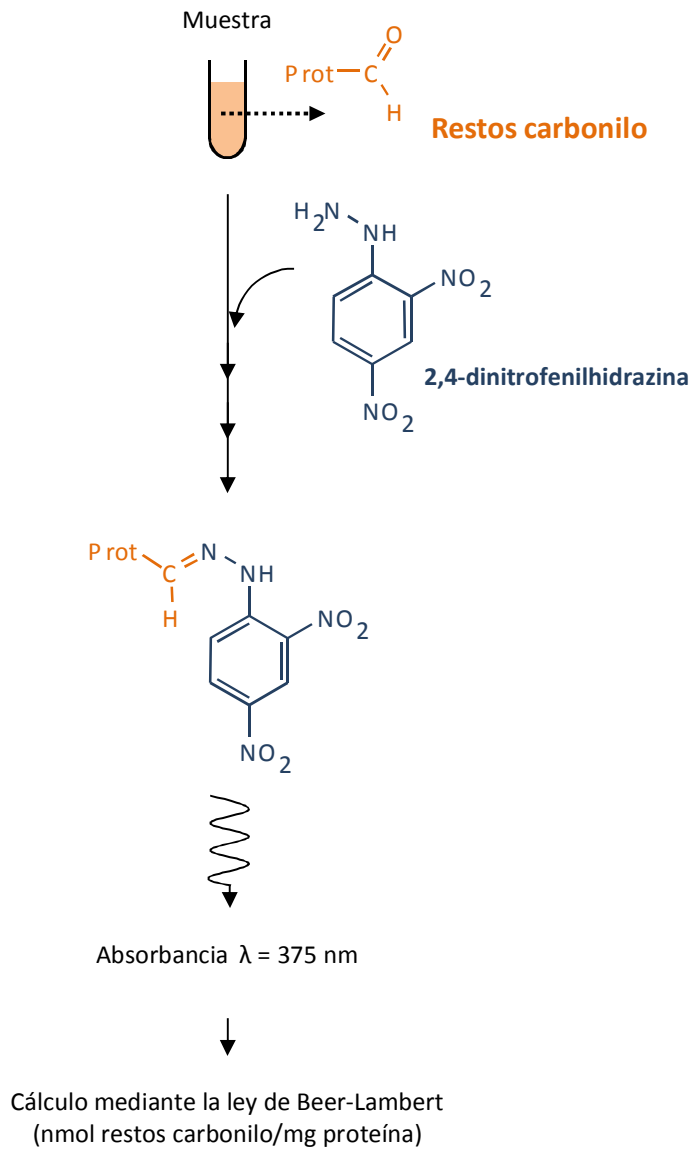


Figura 18. Fundamento de la cuantificación de restos carbonilo en las proteínas.

DETERMINACIÓN DE LA FLUIDEZ DE MEMBRANA

La fluidez se monitorizó en muestras por triplicado usando 1-[4-(trimetilamonio)-fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) como marcador fluorescente. Su incorporación en las membranas previamente aisladas y la determinación de su fluidez se realizó según se describe (Yu, Suescun y cols. 1992). Las membranas (0,5 mg de proteína/mL) se resuspendieron en TRIS 50 mM (volumen final 3 mL) y se mezclaron con TMA-DPH (66,7 nM). Después de mezclar bien en un vórtex durante un minuto, la preparación se incubó a 37°C durante 30 minutos. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un Espectrómetro de Luminiscencia Perkin-Elmer LS-55 equipado con un baño de agua recirculante que mantenía la temperatura a $22,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Las longitudes de onda de excitación y emisión que se utilizaron fueron 360nm y 430 nm respectivamente (Figura 19). La intensidad de emisión de la luz polarizada verticalmente se detectó con un analizador orientado paralelo (I_VV) u horizontal (I_VH) al plano de excitación. Se utilizó también un factor de corrección del sistema óptico, G. La polarización (P) se calculó con la ecuación:

$$P = \frac{I_{V_V} - GI_{V_H}}{I_{V_V} + GI_{V_H}}$$

Existe una relación inversa entre la fluidez de la membrana y la polarización (Yu, Suescun y cols. 1992); por ello, la fluidez de membrana se expresa como 1/P.

Protocolo

- Separar en cada tubo de vidrio 1mL de muestra de membrana (0,5 mg proteína/mL) y añadir 8μL TMA-DPH 25 μM y Tris 50mM hasta completar 3 mL.
- Tapar y agitar 1 min con vórtex.
- Incubar 30min a 37°C 180 rpm.
- Determinar la polarización utilizando las longitudes de onda de excitación y emisión 360nm y 430 nm respectivamente.
- La fluidez se considera como el inverso de la polarización medida.

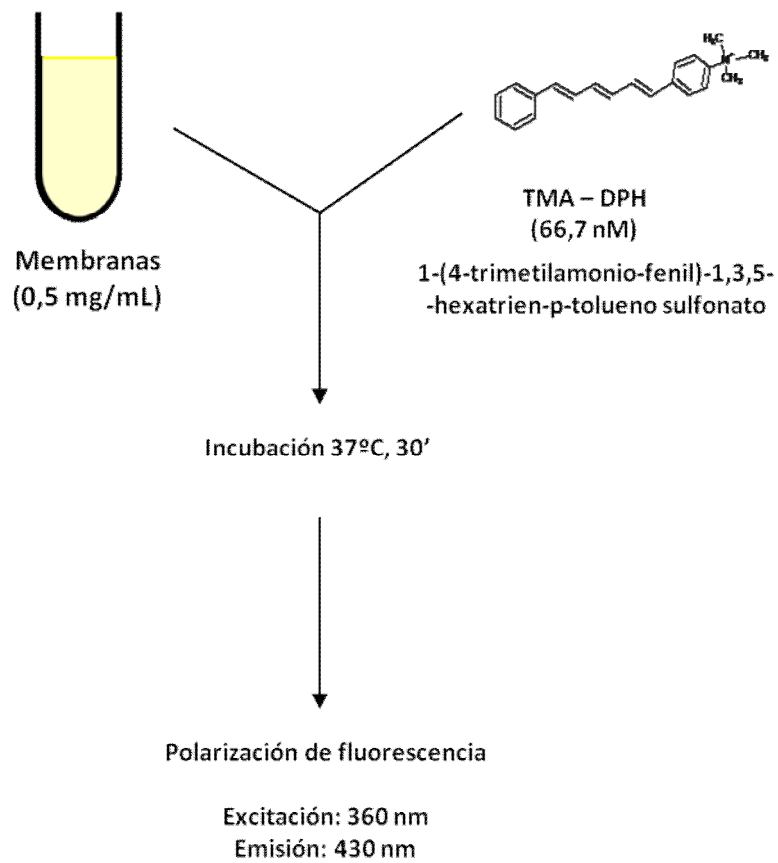
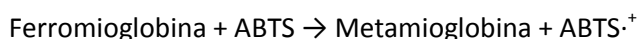
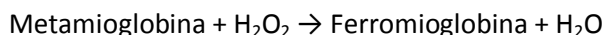


Figura 19. Protocolo de medición de la polarización en las membranas.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TOTAL ANTIOXIDANTE PLASMÁTICA

El fundamento de esta prueba es la capacidad del plasma de inhibir la oxidación del 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) por la metamioglobina y peróxido de hidrógeno para formar el catión radical $ABTS^{\cdot+}$. Esta molécula forma un cromóforo de color verde relativamente estable que puede ser valorado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 600 nm.



La presencia de antioxidantes en la muestra analizada disminuye la producción del color de forma proporcional a la concentración total de antioxidantes (Miller y Paganga 1998). La capacidad de los antioxidantes de la muestra para prevenir la oxidación del ABTS comparado con el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trolox), un análogo hidrosoluble de la vitamina E, se cuantifica como concentración equivalente de Trolox (mM).

Protocolo:

- Introducir en cubetas de espectrofotómetro 8,4 μL de la muestra problema (plasma), 8,4 μL de blanco (agua Milli-Q) y de patrón (Trolox a distintas concentraciones).
- Añadir 18 μL de disolución de metamioglobina purificada (200 μM).
- Agregar 30 μL de ABTS (5mM).
- Añadir 995 μL de tampón PBS. Agitar.
- Añadir 75 μL de H_2O_2 (1mM).
- -Agitar e incubar durante 6 minutos a 30°C.
- Medir absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm.
- Calcular actividad antioxidante, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante} = \frac{\text{Absorbancia blanco} * \text{Absorbancia patrón}}{\text{Absorbancia blanco}}$$

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

La determinación de actividades enzimáticas plasmáticas se midió en unidades de actividad enzimática (U). Una U se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de un μmol de producto por minuto.

1. CATALASA

La actividad enzimática de la catalasa (CAT) se determinó siguiendo el descenso en la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Aebi 1983). Cuando se añade H_2O_2 a una baja concentración (0,2 M) a una muestra que contenga CAT, esta enzima cataliza la transformación del sustrato a oxígeno y agua. Se realizó una curva cinética durante 30 segundos a una longitud de onda de 240 nm para comprobar la actividad de la CAT, utilizando el coeficiente de extinción molar $43,6 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para conocer la cantidad de H_2O_2 eliminado (Wheeler, Salzman y cols. 1990).

Protocolo

- Introducir 20 μL de plasma y añadir 800 μL de tampón fosfato (Na_2HPO_4) 62,5mM pH 7,2.
- Añadir 30 μL de agua purificada.
- Agregar 150 μL de peróxido de hidrógeno (200 mM). Agitar.
- Medir absorbancia a 240 nm durante 30 segundos.
- Determinar la concentración de H_2O_2 eliminado.

2. GLUTATIÓN REDUCATASA

La actividad catalítica de la enzima Glutatión Reductasa (GR) se determinó debido a la oxidación de NADPH a NADP^+ , en presencia de la proteína antioxidante GSSG, siguiendo el descenso en la absorbancia a $\lambda=340 \text{ nm}$ durante 3 minutos, como describieron Goldberg y Spooner (Goldberg y Spooner 1983). El coeficiente de extinción molar utilizado fue el del NADPH, $\epsilon= 6.22 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Protocolo:

- Añadir 33 μL de EDTA (15mM) a 600 μL de tampón fosfato (Na_2HPO_4) 501,38 mM pH 7,2.

- Dispensar 294 μL de agua.
- Agregar 25 μL de plasma, junto con 8 μL de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (10,62 mM) y 30 μL de GSH (67,36 mM).
- Añadir 40 μL de GSSG (20,28 mM)
- Esperar un minuto y comenzar a medir la absorbancia durante 3 minutos a $\lambda=340$ nm.

3. GLUTATIÓN PEROXIDASA

Para determinar la actividad enzimática de la Glutación Peroxidasa (GPx) se observó el continuo descenso en la concentración de NADPH mientras los niveles de GSH se mantuvieron constantes. El protocolo seguido fue el descrito por Flohé y Günzler (Flohe y Gunzler 1984). Este método está basado en el aumento de la absorbancia, a lo largo de tres minutos a una $\lambda=340\text{nm}$, debido a la oxidación de NADPH en presencia de GSH, t-butil hidroperóxido (t-BuO₂H), GR y la muestra. Se usó el coeficiente de extinción molar $\epsilon= 6.22 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para los cálculos.

Protocolo:

- Añadir 33 μL de EDTA (15mM) a 600 μL de tampón fosfato (Na_2HPO_4) 501,38 mM pH7,2.
- Dispensar 115 μL de agua.
- Agregar 30 μL de plasma, junto con 8 μL de NADPH_2^+ (10,62 mM) y 30 μL de GSH (67,36 mM).
- Por último, añadir 30 μL de GSSG (20,28 mM), 20 μL de GR (0,054 U) y t-BuO₂H 1,2mM hasta llegar a un mL total de volumen. Agitar.
- Medir la absorbancia durante 3 minutos a $\lambda=340$ nm.

4. SUPERÓXIDO DISMUTASA

La actividad de la SOD se midió calculando la inhibición del ratio de reducción del citocromo C por el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), determinado a 550 nm. El $\cdot\text{O}_2^-$ se generó en un primer paso mediante la reacción de la xantina y el oxígeno, catalizada por la xantina oxidasa

Esfuerzo físico agudo, estrés oxidativo y melatonina

(Winterbourn, Hawkins y cols. 1975) (Figura 20). Por ello, la definición de una U de SOD es la cantidad de enzima que inhibe el ratio de reducción de citocromo C un 50%. El coeficiente de extinción molar del citocromo C es $\epsilon = 27.6 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Alleyne, Wilson y cols. 1992).

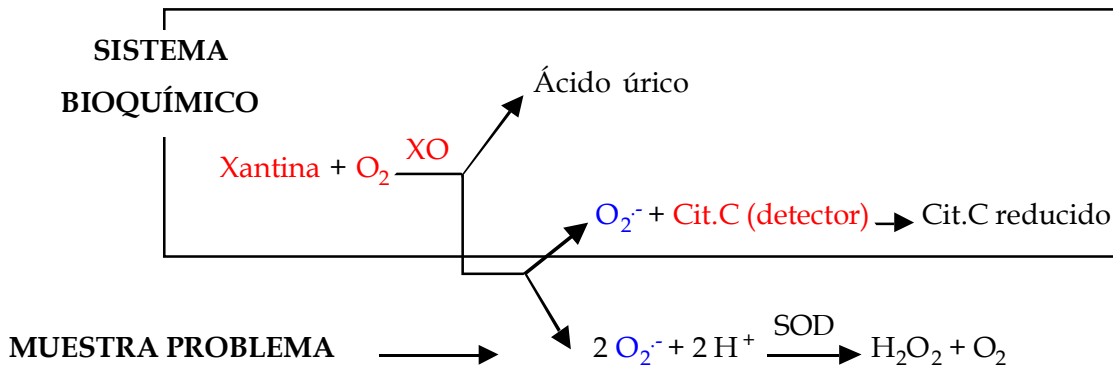


Figura 20. Reacciones implicadas en la valoración de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa.

Protocolo:

Sistema generador de $\cdot\text{O}_2^-$

- Dispensar 70 μL de Xantina (0,999 mM) junto con 60 μL de agua y otros 60 μL de citocromo C.
- Añadir 800 μL de tampón fosfato (Na_2HPO_4) 57,97 mM pH 7,83 y finalmente sumar 10 μL de Xantina oxidasa (0,00294 U). Agitar.
- Medir la absorbancia a 550 nm.

Determinación de la actividad de la SOD

- Dispensar 70 μL de Xantina (0,999 mM) junto con 60 μL de plasma y otros 60 μL de citocromo C.
- Añadir 800 μL de tampón fosfato (Na_2HPO_4) 57,97 mM pH 7,83 y finalmente sumamos 10 μL de Xantina oxidasa (0,00294 U). Agitar.
- Medir la absorbancia a 550 nm.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS DATOS

Las variables cuantitativas se definieron mediante dos parámetros, la media aritmética, como medida de la tendencia central, y el error estándar, como una medida de la dispersión. Por ello, los resultados son expresados siempre como media aritmética \pm error estándar.

En cada grupo de estudio se comprobó la hipótesis de normalidad de las distribuciones mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. El valor de significación estadística se estableció en $P \leq 0,05$.

INFERENCIA ESTADÍSTICA

Teniendo variables que seguían una distribución normal según el resultado de las pruebas de normalidad y por tratarse de datos relacionados, para estudiar las diferencias entre los distintos grupos, se realizó un análisis paramétrico para muestras repetidas. Se aplicó el test de la t de Student para datos apareados para comparar dos grupos, o un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas junto con una corrección de Bonferroni y el test postcontraste de Turkey para comparar más de dos grupos. El nivel de significación aceptado fue $P \leq 0,05$.

RESULTADOS



SUJETOS

Un total de 34 voluntarios varones sanos no entrenados de 19-29 años participaron en este estudio. Sólo se incluyeron varones para evitar cualquier distorsión en la respuesta hormonal al ejercicio causada por diferencias de sexo (Bloomer y Fisher-Wellman 2008). La edad media de los participantes fue de 23 años. Todos los sujetos se encontraban en un rango de índice de masa corporal normal ($23,72 \pm 0,69$). Estas características antropométricas de estas personas se resumen en la Tabla III. Ninguno de ellos participaba regularmente en una competición deportiva y no realizaron ningún tipo de ejercicio intenso ni tomaron medicación en las 24 horas anteriores a las pruebas. Todos los sujetos se sometieron a un reconocimiento médico que incluyó la historia clínica, examen físico, electrocardiograma y perfil bioquímico para descartar posibles patologías. Todos firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio, que fue diseñado siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (referencia CP02/2010).

Tabla III. Datos antropométricos como edad, altura, peso e índice de masa corporal (IMC), y parámetros ergométricos como el consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) y la capacidad máxima de trabajo (MWC).

n = 34	Valores
Edad (años)	23 ± 0.41
Altura (cm)	177.59 ± 1.11
Peso (kg)	75.25 ± 2.84
IMC (kg/m^2)	23.72 ± 0.69
VO_{2max} ($mL \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$)	43.8 ± 1.58
MWC (W)	239.8 ± 7.4

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de 34 varones sanos.

ESTUDIO DE LA FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS ERITROCITARIAS E ÍNDICES PLASMÁTICOS DE DAÑO OXIDATIVO DESPUÉS DE EJERCICIOS FÍSICOS AGUDOS EN HUMANOS

CAMBIOS EN LA FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS ERITROCITARIAS

Los resultados obtenidos sobre los efectos en la fluidez de la membrana de eritrocitos tras un ejercicio, bien sea máximo o submáximo, realizados según los protocolos descritos para la realización de nuestro estudio, se pueden ver en la Figura 21. En las personas que voluntariamente se sometieron a estas ergometrías, el ejercicio agotador realizado de una manera progresiva provocó un descenso de los niveles de fluidez de las membranas eritrocitarias (B: $3,52 \pm 0,30$) en comparación con los valores que se habían obtenido al analizar las membrana aisladas de las extracciones de sangre antes del ejercicio (A: $3,59 \pm 0,31$). Por otro lado, el ejercicio máximo mantenido de manera constante a una intensidad igual al 100% de la alcanzada en la ergometría progresiva, y el ejercicio contante con una carga submáxima (equivalente al 70% de la MWC) durante 30 minutos produjeron un descenso dramático de la fluidez de membrana comparado con el periodo de reposo (C: $3,42 \pm 0,32$ y D: $3,43 \pm 0,42$ respectivamente). Sin embargo, no encontramos variaciones significativas al comparar entre el grado de fluidez tras un ejercicio máximo constante y un ejercicio moderado.

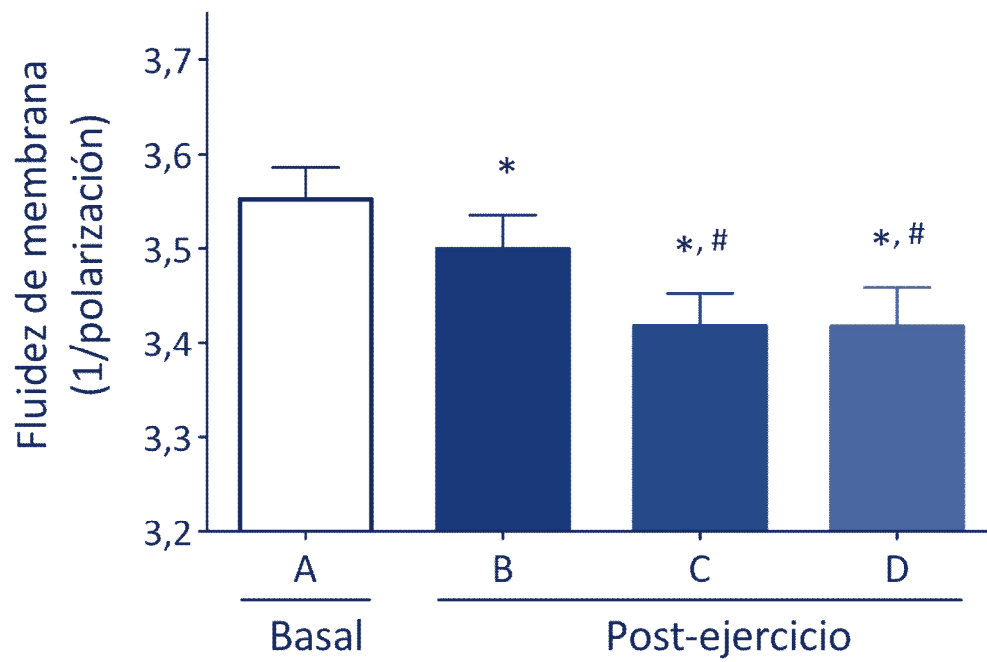


Figura 21. Fluidez de las membranas plasmáticas aisladas de eritrocitos de 34 hombres sanos durante el reposo (A) y tras el ejercicio máximo progresivo (B), continuo (C) y submáximo (70% del máximo) durante 30 minutos (D). Los datos (media \pm error estándar) se expresan como el inverso de la polarización. Diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) frente a pre-ejercicio (*) y frente al ejercicio máximo progresivo (#).

ÍNDICES PLASMÁTICOS DE DAÑO OXIDATIVO

1. CONCENTRACIÓN DE CARBONILOS PROTEICOS

A la hora de medir el daño que se produjo en las proteínas plasmáticas y/o de la membrana celular, también observamos como las concentraciones plasmáticas de carbonilos proteicos (Figura 22) variaron. Tanto en el momento de terminar el test de ejercicio máximo, realizado de una forma progresiva, como justo después de que finalizará el esfuerzo de superar una ergometría continua a una carga constante hasta el agotamiento (B: $2,76 \pm 0,08 \mu\text{M}$ y C: $2,99 \pm 0,09 \mu\text{M}$, respectivamente), la carbonilación proteica aumentó, de modo que la concentración de restos carbonilo en plasma también se vio significativamente incrementada en comparación con la concentración que se había determinado en el plasma de la sangre obtenida en reposo (A: $2,76 \pm 0,08 \mu\text{M}$). En la medición de carbonilos proteicos después de terminar la prueba al 70% de la MWC, es decir, submáxima, no se produjeron cambios significativos comparados con la concentración basal ($2,86 \pm 0,09 \mu\text{M}$ vs. $2,76 \pm 0,08 \mu\text{M}$).

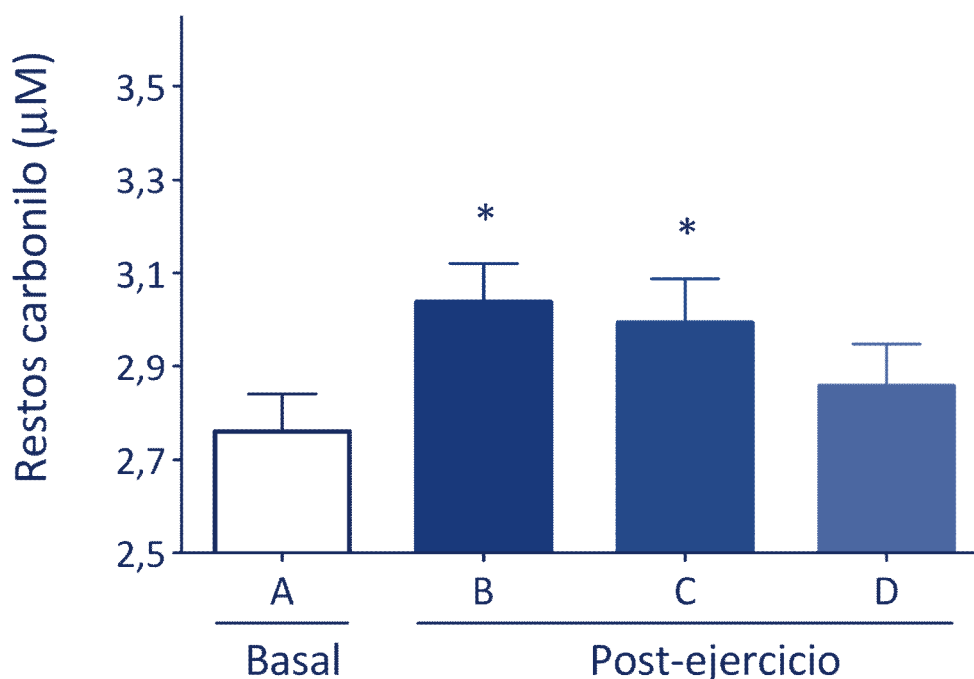


Figura 22. Efecto del ejercicio agudo en la carbonilación proteica plasmática en 34 hombres sanos en reposo (A) e inmediatamente después de distintos protocolos de ejercicio (B, C y D).

Los datos se expresan como media \pm error estándar. *Diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) frente a reposo.

2. CONCENTRACIÓN DE MDA+4-HDA

Otro marcador de daño oxidativo, esta vez relacionado con los lípidos, tanto de la sangre como de las membranas que determinamos fueron las concentraciones combinadas de MDA + 4-HDA, que como decía, se utilizaron como índice de peroxidación lipídica en muestras biológicas. Tras medir la concentración, se llevó a cabo un análisis estadístico de los niveles de MDA + 4-HDA plasmáticos para observar el daño oxidativo a lípidos. Este no mostró efectos significativos tras ninguno de los protocolos de ejercicio. Ninguno de los test de esfuerzo máximo ni el de esfuerzo submáximo, (A = $3,09 \pm 0,26 \mu\text{M}$; B = $2,97 \pm 0,29 \mu\text{M}$; C = $3,19 \pm 0,32 \mu\text{M}$; D = $3,23 \pm 0,33 \mu\text{M}$) revelaron cambios significativos (Figura 23). El aparente aumento de los niveles de MDA + 4-HDA en plasma al final del ejercicio máximo continuo y el submáximo no fue significativo frente al nivel basal o de reposo ($P=0,646$ y $0,621$, respectivamente).

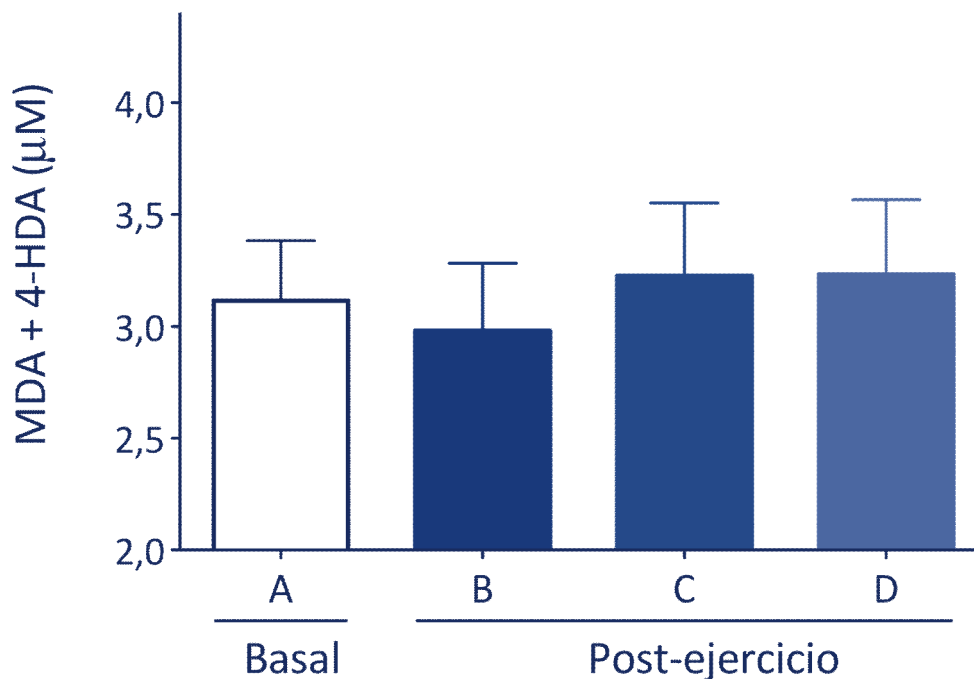


Figura 23. Concentraciones plasmáticas de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetonales (4-HDA) en 34 hombres sanos durante el reposo e inmediatamente post-ejercicios (B, C y D).

Los datos se expresan como media \pm error estándar.

Todos estos resultados han sido objeto de la siguiente publicación:

Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans.

(Eur J Appl Physiol. 2011 Jun;111(6):1127-33. Epub 2010 Nov 30. PubMed PMID: 21116825.)

EL EJERCICIO AGUDO INCREMENTA LA ACTIVIDAD TOTAL ANTIOXIDANTE Y LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DEL PLASMA EN HOMBRES NO ENTRENADOS

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD TOTAL ANTIOXIDANTE

Además de comprobar cómo afectaría el estrés oxidativo generado por el ejercicio a las diferentes macromoléculas de la membrana y a su dinámica, se determinaron los cambios que se producen tanto en la actividad total antioxidante (TAS) del plasma, así como la actividad de diferentes enzimas antioxidantes. La determinación de la TAS tras un ejercicio progresivo y continuo, resultó en un aumento frente al nivel basal. Incrementó hasta el equivalente a $1,62 \pm 0,07$ mM de Trólox mientras que en reposo equivalía a $1,53 \pm 0,07$ mM de Trólox. Tras la realización de un esfuerzo máximo mantenido al nivel del $VO_{2\text{máx}}$ se produjo el mayor aumento de actividad total antioxidante de los tres protocolos de ejercicio estudiados, alcanzando un equivalente a $1,66 \pm 0,08$ mM de Trólox. Finalmente, se midió la TAS del plasma tras una ergometría submáxima. El resultado no es tan alto como tras los ejercicios máximos, obteniendo un equivalente a la actividad antioxidante de $1,61 \pm 0,08$ mM de Trólox. Sin embargo, todos los resultados obtenidos con esta prueba sufrieron un incremento significativo frente al nivel basal, como podemos observar en la Figura 24.

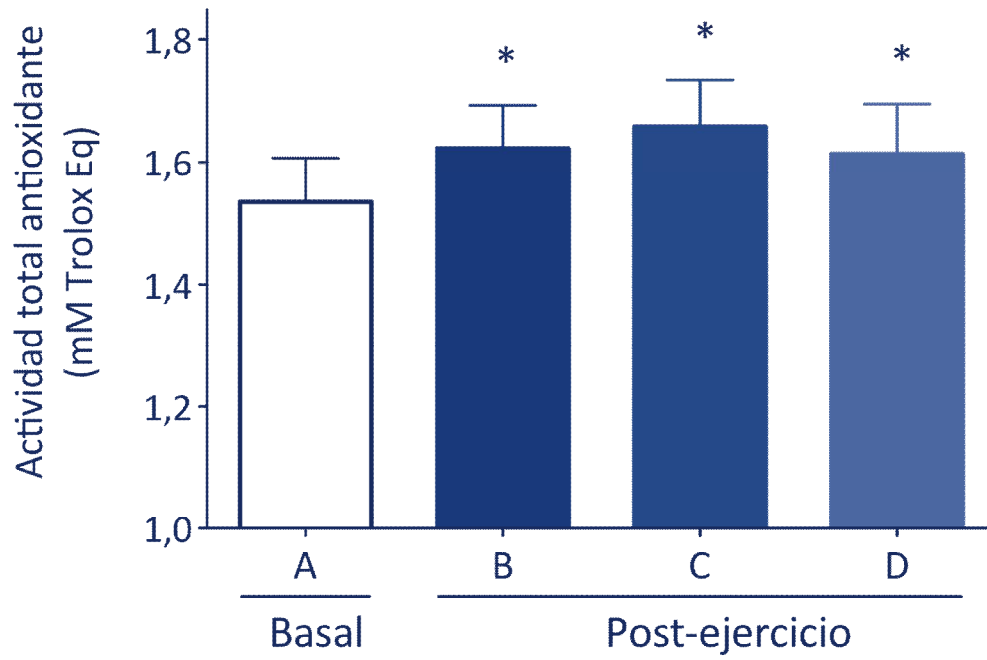


Figura 24. La actividad total antioxidante en plasma de 34 hombres sanos en reposo (A) e inmediatamente después de realizar un ejercicio máximo progresivo (B), un test mantenido hasta el agotamiento (C) y una prueba submáxima (70% de la carga máxima de trabajo) durante 30 minutos (D).

Los datos se expresan como la media \pm error estándar. * Diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) frente al estado basal.

CAMBIOS EN LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

En cuanto a los cambios producidos en las actividades enzimáticas, se estudió, enzima por enzima, como variaban tras los diferentes estímulos provocados por el ejercicio. En cuanto a la enzima catalasa (CAT), el protocolo de ejercicio en el que la intensidad se mantenía constante al nivel máximo que se alcanzó en la determinación de $VO_{2\text{máx}}$ produjo el mayor incremento en su actividad ($42,29 \pm 2,84$ U). El valor obtenido antes de la realización de ejercicio o valor de reposo fue $18,54 \pm 1,97$ U. Tras la realización de un esfuerzo continuo y progresivo, que también sirvió para determinar las cargas de trabajo y medir parámetros respiratorios, se vio un incremento de actividad que llegó hasta $24,85 \pm 2,35$ U. Por último, un esfuerzo submáximo durante 30 minutos estimuló la actividad de la CAT alcanzando $29,19 \pm 3,89$ U, lo que supuso que todos los protocolos de ejercicio aumentaron significativamente la actividad enzimática comparados con la situación de reposo (Figura 26).

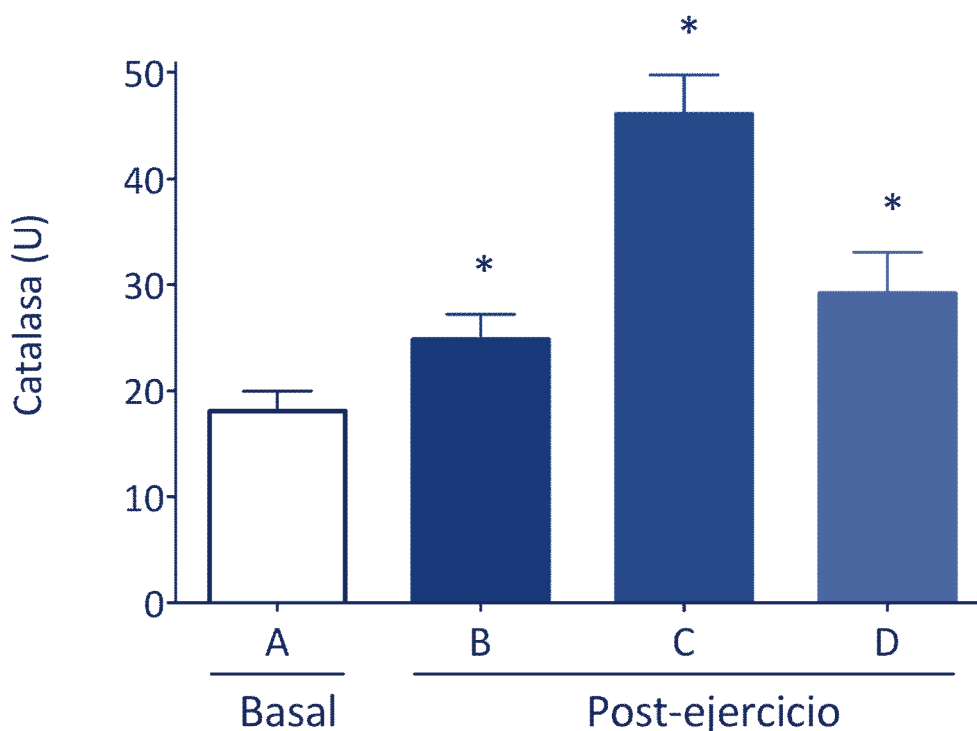


Figura 25. Actividad de la catalasa (CAT) en plasma de 34 hombres sanos en reposo (A) y justo después de realizar un ejercicio (B, C y D).

Los datos se expresan como la media \pm error estándar. * Diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) frente al estado basal.

La actividad enzimática de la GR como de la GPx también se determinó tras los diferentes ejercicios. Las actividades de la GR fueron más altas tras un ejercicio submáximo e

incluso más elevadas tras los protocolos máximos de esfuerzo, continuo o progresivo (Figura 26). La actividad enzimática aumentó comparada con el nivel basal de $0,021 \pm 0,002$ U, aumentando hasta $0,031 \pm 0,003$ U tras un ejercicio máximo con un aumento progresivo de la carga, hasta $0,031 \pm 0,003$ U después de un esfuerzo máximo mantenido con una carga igual a la máxima obtenida en el esfuerzo progresivo y hasta $0,026 \pm 0,003$ U tras una ergometría submáxima durante 30 minutos.

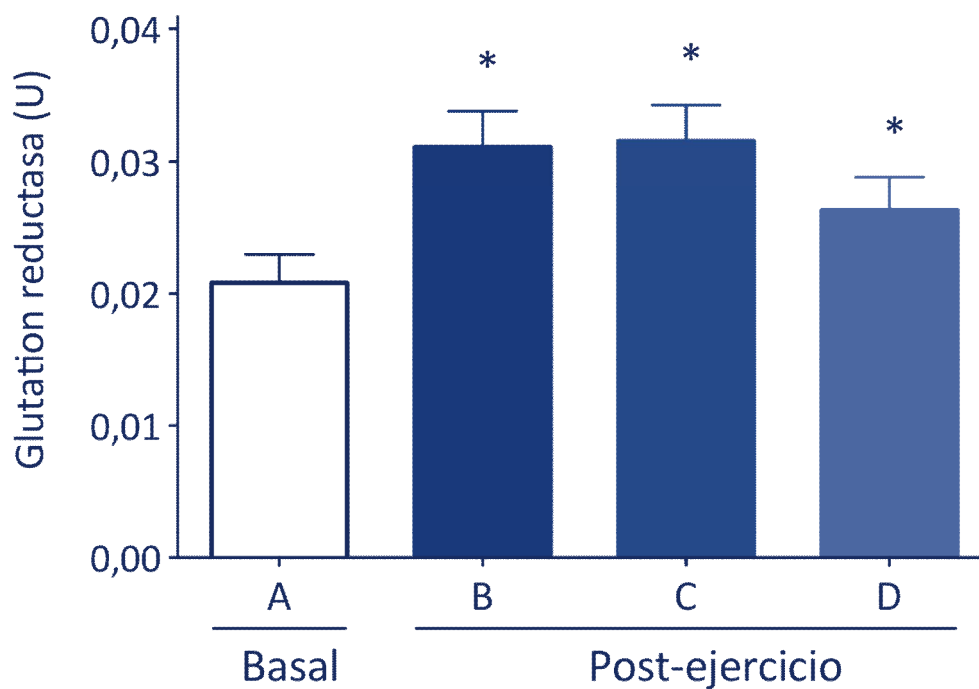


Figura 26. Actividad de la glutatión reductasa en el plasma de 34 hombres sanos a nivel basal (A) y después de realizar tres esfuerzos (B, C y D).

Los datos se expresan como la media \pm error estándar. *Diferencias estadísticas ($P < 0,05$) frente al estado basal.

La actividad que se determinó de GPx también fue mayor después de la realización de distintos tipos de ejercicio (Figura 27). Antes de comenzar cada prueba, se midió dicha actividad resultando un valor basal de $0,94 \pm 0,02$ U. Se produjo un aumento claro después de la ejecución de un esfuerzo máximo con un aumento progresivo de la carga. Se observó un valor de $1,03 \pm 0,3$ U. En otro tipo de esfuerzo máximo, mantenido en el tiempo, se alcanzó una actividad de $1,02 \pm 0,03$ U. Como último valor, se determinó una actividad de $1,02 \pm 0,03$ U después de terminar un ejercicio submáximo de 30 minutos.

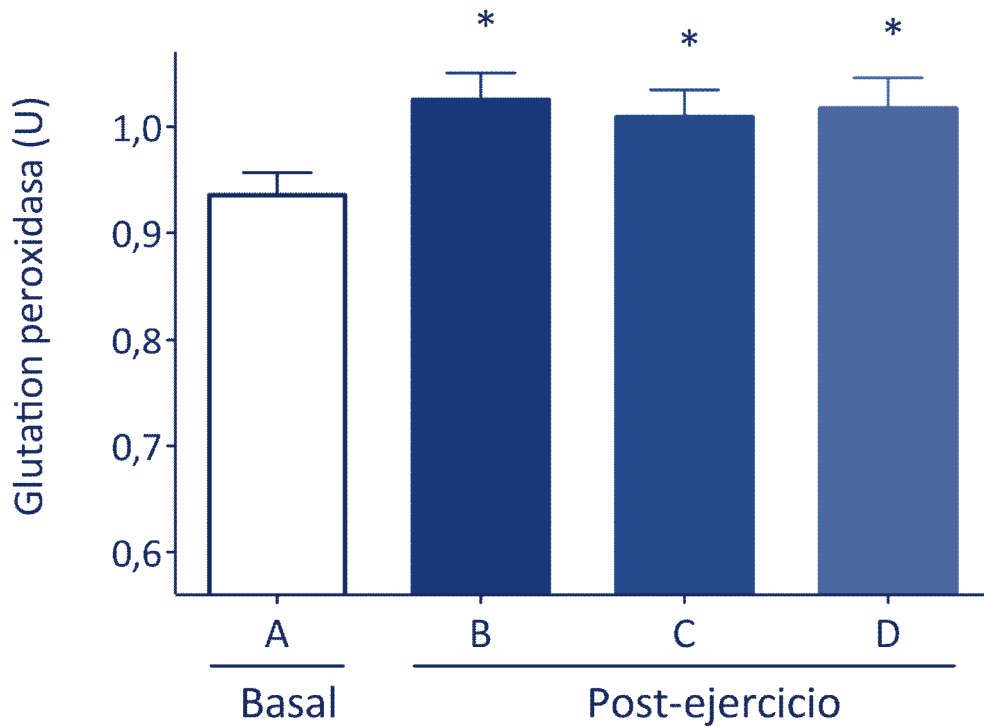


Figura 27. Actividad de la glutatión peroxidasa en el plasma basal (A) e inmediatamente después de realizar un ejercicio máximo progresivo (B), un test mantenido hasta el agotamiento (C) y una prueba submáxima (70% de la carga máxima de trabajo) durante 30 minutos(D).

Los datos se expresan como la media \pm error estándar ($n=34$). *Diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) frente al estado basal.

Tras la medición del valor en reposo de la SOD, $0,018 \pm 0,004$ U, se observó que su actividad incrementó significativamente después de realizar una prueba de esfuerzo máxima con un nivel de esfuerzo mantenido hasta el agotamiento, alcanzando una actividad de $0,028 \pm 0,007$ U. Pero fue después de un ejercicio submáximo cuando se detectó una mayor actividad enzimática, aumentando esta hasta un valor de $0,033 \pm 0,007$ U (Figura 28).

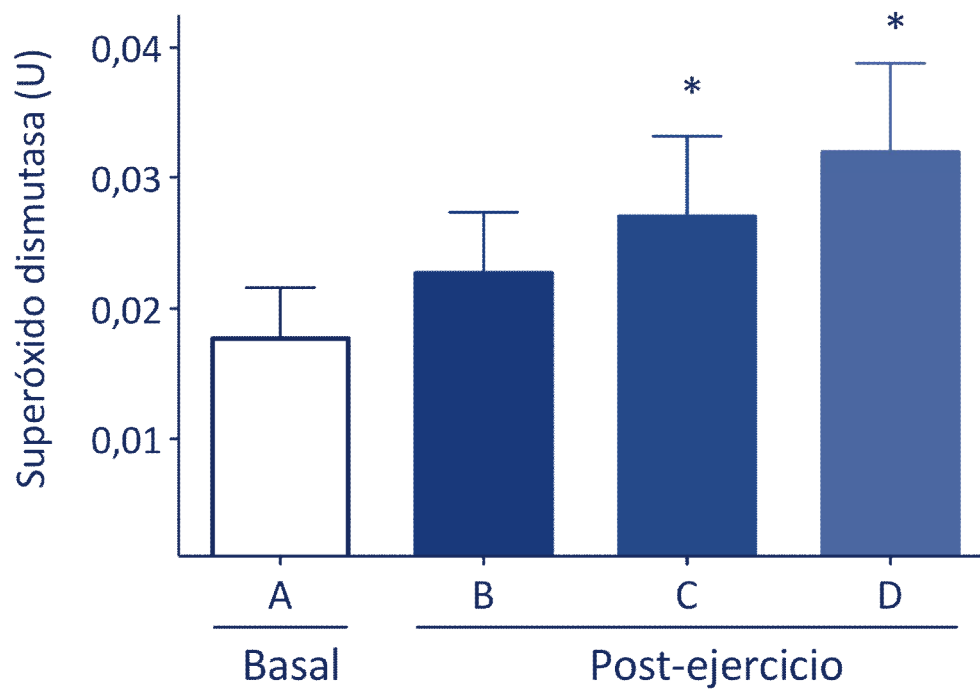


Figura 28. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en el plasma de 34 hombres sanos durante el reposo (A) y tras dos ejercicios máximos (B y C) y uno submáximo (D).

Los datos se expresan como la media \pm error estándar. *Diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) frente a pre-ejercicio.

Todos estos resultados han sido objeto de la siguiente publicación:

Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men.

(J Biomed Biotechnol. 2011, DOI: 10.1155/2011/540458 Epub 2011 Mar 9).

LA MELATONINA COMO AYUDA ERGOGÉNICA EN EL EJERCICIO AGUDO

La última parte de nuestra investigación se ha centrado en el uso de la melatonina como posible potenciador de la capacidad de trabajo físico. Para ello, determinamos la duración y la distancia total recorrida de dos grupos de ratas, uno tratado con melatonina (M) y otro que realizó el ejercicio sin melatonina (E). Como se puede ver en la Figura 29, el grupo de ratas suplementadas con melatonina estuvo corriendo durante un tiempo (A) y una distancia (B) significativamente mayores que las que lograron el grupo E. Debido a que era una prueba incremental, la distancia recorrida es mucho mayor en el grupo M que en el E, que estuvo corriendo durante menos tiempo.

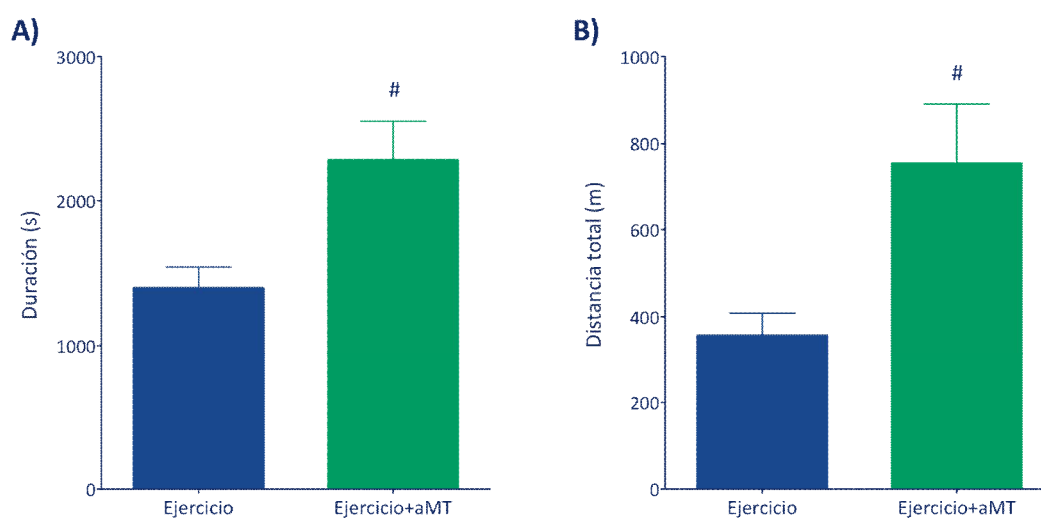


Figura 29. Duración (A) y distancia total recorrida (B) de las ergometrías realizadas en 10 ratas, 5 de ellas tratadas con melatonina (aMT).

N=5 en cada grupo. Los datos se expresan como la media ± error estándar. #, Diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) frente al grupo sin tratamiento con melatonina.

En cuanto a su velocidad de carrera alcanzada durante la ergometría, también podemos observar que fue mayor en el grupo al que se administró melatonina que en el que únicamente realizó la prueba (Figura 30 A). Su máximo consumo de oxígeno relativo al peso corporal, en el momento de más esfuerzo, también fue significativamente mayor en el grupo M que en el grupo E (Figura 30 B).

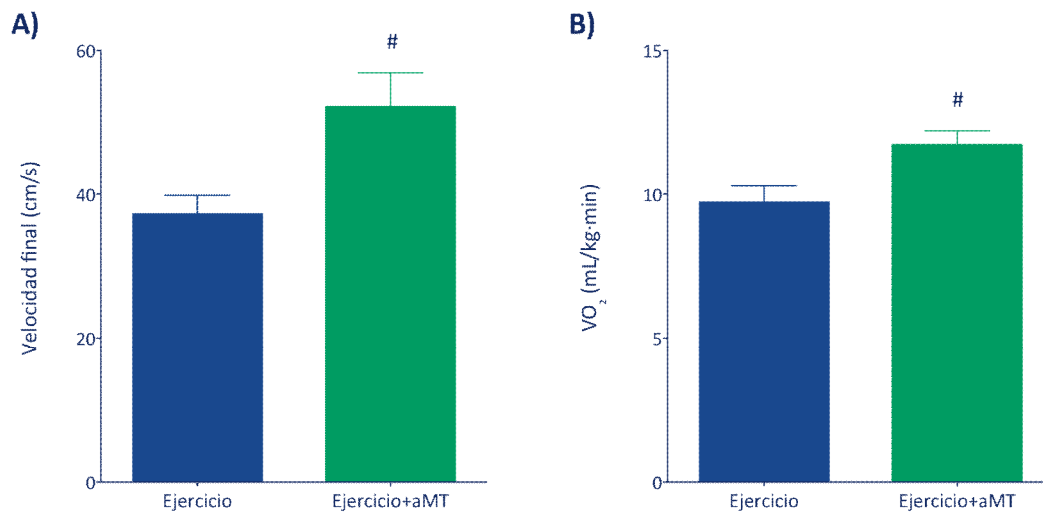


Figura 30. Velocidad final (A) y consumo máximo de oxígeno (VO₂) (B) alcanzados en las ergometrías realizadas en 10 ratas, 5 de ellas tratadas con melatonina (aMT).

N=5 en cada grupo. Los datos se expresan como la media ± error estándar. #, Diferencias estadísticas (P≤0,05) frente al grupo sin tratamiento con melatonina.

En resumen, en cuanto al rendimiento físico podemos decir que el grupo tratado con melatonina estuvo corriendo más tiempo, más distancia, a más velocidad y que alcanzó un VO₂máx. mayor que el grupo que realizó ejercicio sin melatonina.

DISCUSIÓN

ESTUDIO DE LA FLUIDEZ DE LAS MEMBRANAS ERITROCITARIAS E ÍNDICES PLASMÁTICOS DE DAÑO OXIDATIVO DESPUÉS DE EJERCICIOS FÍSICOS AGUDOS EN HUMANOS

(Eur J Appl Physiol. 2011 Jun;111(6):1127-33. Epub 2010 Nov 30. PubMed PMID: 21116825.)

La primera parte de nuestro estudio realizado en humanos demuestra que tras un periodo agudo de ejercicio extenuante o ejercicio submáximo controlado se produce un descenso de la fluidez de la membrana de eritrocitos. Según nuestros conocimientos, este es el primer estudio que muestra que el ejercicio físico agudo afecta a la fluidez de la membrana de los eritrocitos en varones sanos adultos realizando la medición de fluidez de membrana por espectroscopía de fluorescencia. El principio del análisis con espectroscopía de fluorescencia está basado en la intercalación dentro de la membrana biológica de una molécula fluorescente, en este caso TMA-DPH, la cual, al ser iluminada por luz polarizada, emite una señal fluorescente. El grado de polarización depende del estado de movilidad del TMA-DPH, el cual refleja el movimiento de los lípidos de la membrana (Yu, Suescun y cols. 1992). Nuestros resultados están en concordancia con la rigidez detectada en membranas mitocondriales aisladas de músculo esquelético inmediatamente después de un ejercicio extenuante en ratas Sprague-Dawley (Li, Tong y cols. 1999). Estos autores marcaron las membranas con otro compuesto, difenilhexatrieno (DPH). El TMA-DPH es un derivado del DPH, que incorpora un grupo trimetilamonio para mejorar su localización en la membrana. Así pues, el TMA-DPH se intercala paralelamente al eje longitudinal de los fosfolípidos de las membranas con el residuo catiónico orientado a la superficie (Prendergast, Haugland y cols. 1981).

Hay observaciones previas utilizando otra técnica para medir la fluidez de la membrana, la espectroscopía por resonancia de spin electrónico. La fluidez de membrana de eritrocitos obtenidos de caballos de competición disminuyó después de una competición hípica estándar, la cual incluye un tramo final a la máxima velocidad (De Moffarts, Portier y cols. 2007). Se obtuvieron resultados similares, rigidez en la membranas, en cuatro perros sedentarios después de un ejercicio submáximo en un estudio para comprobar el papel preventivo de la vitamina E sobre el daño oxidativo provocado por este (Motta, Letellier y cols. 2009). Finalmente, Brzeszczynska y cols. (2008) detectaron rigidez de eritrocitos 1 hora después de una prueba incremental hasta el agotamiento en bicicleta realizada por 11 varones sanos no

entrenados. Estos autores emplearon 3 marcadores de spin, ácidos 5-, 12- ó 16-doxilesteáricos para obtener información acerca de los cambios en el microambiente de la región próxima a ellos, a diferentes profundidades de la bicapa lipídica. Sólo se detectó un incremento con el marcador ácido 5-doxilesteárico, por lo que concluyeron que el ejercicio indujo un descenso en la fluidez de la membrana eritrocitaria en la región polar de estas (Brzeczynska, Pieniazek y cols. 2008). Para medir cambios en esta región específica, nosotros elegimos el TMA-DPH porque la región polar del marcador se coloca en la interfase lípido-acuosa, mientras que la parte hidrocarbonada entra en la zona lipídica de la membrana. La longitud de la parte hidrofóbica de la molécula de TMA-DPH, es aproximadamente equivalente al carbono 10 de la cadena alifática (Kuhry, Fonteneau y cols. 1983) y esto nos proporciona información sobre la región más superficial y del extremo glicerol de la membrana plasmática (Prendergast, Haugland y cols. 1981).

Sin embargo, en el caso de realizar un ejercicio regular, muchos estudios sugieren que aumenta la fluidez y mejora la viscosidad de la membrana de eritrocitos humanos (Cazzola, Russo-Volpe y cols. 2003; Kamada, Tokuda y cols. 1993; Tsuda, Yoshikawa y cols. 2003). Los eritrocitos son esenciales para la rápida y homogénea difusión del oxígeno en la microcirculación (Dutta-Roy, Ray y cols. 1985), por lo que el aumento de la fluidez de la membrana y la disminución de la microviscosidad, ambas debidas al entrenamiento aeróbico, jugarán un papel importante en la difusión del oxígeno intraeritrocitario en la microcirculación (Tsuda, Yoshikawa y cols. 2003).

Se han propuesto numerosas razones estructurales como causa de la rigidez de la membrana de los glóbulos rojos. La primera, puede deberse a cambios en la composición de los lípidos de la membrana, por ejemplo, un descenso de la relación ácidos grasos poliinsaturados/saturados en la membrana (Curtis, Gilfor y cols. 1984; Shinitzky 1984). Está bien documentado que el ejercicio produce un exceso de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Bloomer y Fisher-Wellman 2008; Powers y Jackson 2008). Sabiendo que los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente sensibles al comportamiento agresivo de los radicales libres (Gutteridge 1995), parece razonable que el daño oxidativo a la bicapa lipídica de los eritrocitos esté relacionado con su rigidez debido al ejercicio físico. En segundo lugar, el estrés oxidativo en membranas biológicas induce la formación de puentes cruzados entre fragmentos lípido-lípido y lípido-proteína (Chen y Yu 1994). Tercero, las proteínas de la membrana puede ser reguladoras de la fluidez de esta (Shinitzky 1984). Los grupos tiol de estas proteínas se oxidan fácilmente por los radicales libres (Nakazawa, Genka y cols. 1996), y se ha propuesto que el ejercicio puede provocar la agregación del complejo proteico

espectrina-actina del citoesqueleto, lo que produce un descenso en la dinámica de la membrana (Brzeszczynska, Pieniazek y cols. 2008).

La fluidez de la membrana es una característica físico-química de las membranas celulares que juega un rol importante modulando las funciones de los eritrocitos como la permeabilidad, el transporte de iones u oxígeno, la actividad de enzimas asociadas a la membrana y la fragilidad osmótica (Derby y Gleeson 2007; Shinitzky 1984; Sudhakar, Haney y cols. 2008). Por lo que mantener unos niveles adecuados de fluidez de membrana en el eritrocito es esencial para la fisiología celular óptima. Durante el ejercicio, los glóbulos rojos están altamente expuestos a estrés tanto mecánico como oxidativo, aun más que otras células, especialmente considerando que los eritrocitos están produciendo constantemente radicales libres y que tienen una capacidad de reparación muy pobre (Cimen 2008; Petibois y Deleris 2005). Numerosos estudios hablan de que el ejercicio vigoroso reduce de manera aguda la deformabilidad de los eritrocitos (Eichner 1985; Szygula 1990), y que el estrés oxidativo produce oxidación de lípidos y proteínas en la membrana, lo que desestabiliza la bicapa lipídica y el citoesqueleto, comprometiendo así la supervivencia celular (Dumaswala, Zhuo y cols. 1999). La rigidez de la membrana de eritrocitos debida al ejercicio físico agudo detectada durante nuestro estudio es consistente con estos hallazgos.

Además de la fluidez de la membrana, detectamos un incremento del daño oxidativo en plasma debido al ejercicio físico, aunque estos efectos fueron detectados específicamente en biomoléculas; esto es, el incremento de la oxidación de las proteínas plasmáticas tras el ejercicio, mientras la oxidación lipídica en plasma se vio mínimamente afectada.

La oxidación de proteínas debido al estrés oxidativo provoca una pérdida de su función biológica y modificaciones estructurales, por ejemplo, la adición de grupo carbonilo en su residuos aminoterminales (Davies y Goldberg 1987; Levine y Stadtman 2001). En esta línea, la carbonilación proteica en plasma aumentó de manera aguda en varones sometidos a un entrenamiento de fuerza tras una sesión de ejercicio anaeróbico (Bloomer, Davis y cols. 2007; Bloomer y Fisher-Wellman 2008). La magnitud del daño proteico debido al ejercicio aeróbico depende de su intensidad. Se ha comprobado recientemente que un sólo ejercicio de 40 minutos elevaba la cantidad de grupos carbonilo en el plasma de hombres entrenados de manera dependiente de la carga de trabajo (Lamprecht, Greilberger y cols. 2008). Además, otros autores observaron que el daño oxidativo a las proteínas plasmáticas se produce tras ejercicios realizados tanto al 75% como al 80% del VO_{2max} . Aún con todo, estas alteraciones sólo fueron estadísticamente significativas tras el 80% del VO_{2max} . De acuerdo con estos

estudios previos, encontramos aumentos significativos en la carbonilación proteica cuando voluntarios no entrenados realizan ejercicios máximos (B y C). Pero no podemos decir que haya cambios significativos en la oxidación de proteínas tras un ejercicio submáximo con una carga del 70% del VO_{2max} durante 30 minutos.

Finalmente, se ha demostrado que el ejercicio agudo eleva las concentraciones de MDA y otros productos resultantes de la peroxidación lipídica en músculos activos (Alessio, Hagerman y cols. 2000; Davies, Quintanilha y cols. 1982; Ji y Fu 1992; Li, Tong y cols. 1999) así como en otros tejidos y en el plasma (Brzeczczynska, Pieniazek y cols. 2008; Motta, Letellier y cols. 2009). En contraste con estas observaciones, pero según nuestros resultados, otros investigadores encontraron que el ejercicio modifica mínimamente o incluso reduce el grado de peroxidación lipídica, presumiblemente por incremento de la capacidad del sistema antioxidante (Bloomer, Davis y cols. 2007; Groussard, Rannou-Bekono y cols. 2003; Kim, Yu y cols. 1996) o debido a un aumento del aclarado o distribución a través del cuerpo (Leaf, Kleinman y cols. 1997).

En conclusión, esta primera parte de nuestro estudio muestra que las membranas de eritrocitos de varones sanos no entrenados fueron menos fluidas tras un periodo de ejercicio agudo máximo o submáximo. Basándonos en la elevación de la carbonilación proteica en plasma, un marcador de daño oxidativo sistémico, así como en los efectos prooxidantes relatados con anterioridad, parece razonable atribuir los cambios en la dinámica de la bicapa lipídica de eritrocitos a la sobreproducción de radicales libres.

EL EJERCICIO AGUDO INCREMENTA LA ACTIVIDAD TOTAL ANTIOXIDANTE Y LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DEL PLASMA EN HOMBRES NO ENTRENADOS

(J Biomed Biotechnol, 2011; DOI: 10.1155/2011/540458)

Como ya habíamos visto, el estrés oxidativo es una alteración en el equilibrio entre la generación de ROS/RNS y los niveles antioxidantes a favor de la formación de radicales libres (Sies y Mehlhorn 1986). Aunque hay un consenso general sobre que la sobreproducción de radicales libres se da, sobretodo, en el músculo esquelético (Jackson 2005; McArdle, Pattwell y cols. 2001; Vina, Gomez-Cabrera y cols. 2000), también está muy bien documentado que el ejercicio causa un daño oxidativo sistémico. Basándose en estas premisas, Sureda y cols. (2007) encontraron después de una sola sesión de ejercicio intenso un aumento de malonildialdehído, un marcador relacionado con la peroxidación lipídica debida al estrés oxidativo, en otras células sanguíneas, los linfocitos. Pero además, otros investigadores como Ajmani y cols. (2003) midieron un aumento en la rigidez de la membrana de los eritrocitos después de un ejercicio intenso debido al estrés oxidativo generado. Esta rigidez en la membrana significa una elevación de la peroxidación de los lípidos que la forman.

El principal hallazgo de nuestro trabajo es el aumento de la TAS en la sangre de humanos, tras una sola sesión de ejercicio, independientemente de si este es máximo o es submáximo. La TAS plasmática es una combinación de numerosas defensas antioxidantes, incluyendo sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Tal y como vemos aquí, Child y cols. (1998) detectaron niveles de TAS más altos después de un ejercicio extenuante, es decir, equivalente a media maratón. Concluyeron que el ácido úrico, un componente muy importante de los sistemas antioxidantes, es responsable de una tercera parte de este incremento en la TAS. Aunque el ácido úrico posiblemente contribuya a las defensas antioxidantes, otra posible explicación de este incremento de la actividad total antioxidante es que se produzcan cambios en otras defensas antioxidantes como el GSH, la melatonina o las enzimas antioxidantes (Yu 1994). También hemos demostrado que la actividad antioxidante de las enzimas CAT, GPx, GR y SOD, fue mayor después de la realización de un esfuerzo que en reposo, y estos cambios se relacionan con el incremento de la TAS.

Además hay evidencias de que las actividades de la CAT, GPx y GR aumentan en el músculo esquelético durante el ejercicio. Ji y cols. (1992; 1992) observaron en dos estudios consecutivos que una simple carga de ejercicio agudo aumentaba la actividad de estas enzimas

antioxidantes en el músculo de rata. En su primer informe, los animales realizaban un ejercicio hasta el agotamiento en una cinta ergométrica (Ji y Fu 1992). El segundo estudio, se diseñó para comparar dos protocolos de ejercicio diferentes, uno máximo y otro submáximo y, tal como hemos observado también nosotros, las actividades de CAT, GPx y GR aumentaron debido al ejercicio realizado (Ji, Fu y cols. 1992). La actividad de la SOD también sufrió un incremento justo después de un solo ejercicio extenuante y también durante la recuperación. Se realizó un ejercicio aeróbico, que no generase daño muscular, en un cicloergómetro (Khassaf, Child y cols. 2001). En este artículo, las muestras de tejido fueron tomadas, mediante una biopsia, del vasto lateral externo de la pierna de los sujetos que habían realizado la prueba.

El efecto del ejercicio agudo sobre las actividades de las enzimas antioxidantes parece ser sistémico, implicando a varios órganos. Después de la realización de un test en la piscina, Terblanche y cols. (2000) describieron que la actividad de la CAT era mayor comparada con el nivel de reposo en varios tejidos. Tanto en ratas macho como hembra, encontró este aumento en hígado, riñón y pulmón. Estos autores proponen que este aumento durante el ejercicio se debe a un mecanismo de defensa en todos los tejidos frente a la producción de peróxido de hidrógeno.

También se vio que esta respuesta enzimática, de la SOD y CAT, fue mucho mayor en ratas jóvenes que viejas, en las cuales la respuesta estaba significativamente deprimida. Esto sugiere que el envejecimiento exagera la depresión de los sistemas de defensa antioxidante (Hatao, Oh-ishi y cols. 2006). Hara y cols. (1996) también observaron que se producía un aumento de la actividad de la GPx tras una sesión de natación tanto a nivel hepático como del músculo esquelético.

La naturaleza invasiva que tiene la obtención de muestras de músculo por la técnica de la biopsia, limita el acceso al músculo de humanos que estén realizando o hayan terminado algún tipo de ejercicio. Debido a ello, la mayor parte de los estudios se centran en cambios producidos en la sangre. Así pues, Aguiló y cols. (2005), han encontrado recientemente una elevación en la actividad de la CAT y la GR en los hematíes. Cases y cols. (2006) vieron también un incremento en la actividad antioxidante de la CAT, GPx y SOD tras un ejercicio agudo, tanto en cicloergómetro como en la piscina. Estos autores proponen que el estrés oxidativo generado y la necesidad de protegernos de él, pueden ser, al menos en parte, la causa del aumento de las actividades de estas enzimas inducidas por el ejercicio físico. A pesar de ello, el mismo grupo de investigación encontró un descenso en la CAT y GPx tras una sola sesión de

ejercicio (Ferrer, Tauler y cols. 2009). Esta paradoja podría explicarse porque posiblemente estas células liberen sus enzimas en el plasma. De acuerdo con nuestros resultados, Elosua y cols. (2003) también han descrito que las actividades extracelulares de SOD y GPx incrementaron con respecto al nivel basal al finalizar un ejercicio agudo. Aunque una hora después, mientras se producía la recuperación del sujeto, las actividades enzimáticas descendieron hasta los niveles iniciales. A pesar de esto, las actividades volvieron a aumentar pasadas veinticuatro horas, quizá debido a un aumento de la regulación genética de ellas (Elosua, Molina y cols. 2003).

Recientemente, el interés se ha centrado en el efecto del entrenamiento en estos sistemas de defensa antioxidante. Shin y cols. (2008) estudiaron el efecto de un entrenamiento de resistencia aeróbica durante seis meses en la respuesta frente a un ejercicio agudo. Estos autores observaron que la actividad de las enzimas antioxidantes fue mucho mayor que antes de comenzar el entrenamiento. Como posible explicación a este fenómeno provocado por el entrenamiento, tenemos la teoría de que el ejercicio continuado estimula la expresión de genes que están involucrados en la regulación de las enzimas antioxidantes gracias a una vía de transcripción sensible a los cambios en el estado redox de la célula. Esta vía es fundamentalmente la de factor nuclear κB (NF- κB). Hay numerosos estudios que resaltan la importancia de este factor nuclear en la expresión de enzimas como la SOD y la iNOS en músculo esquelético de rata (Gomez-Cabrera, Domenech y cols. 2008). De nuevo Ji y cols. (2007) observaron que las ratas que realizaban ejercicio, al inyectarles alopurinol, que es un inhibidor competitivo de la xantina oxidasa, atenuaba la producción de radicales libres en comparación con otro grupo de ratas no tratado. Incluso la unión NF- κB aumentó dramáticamente con el ejercicio pero estuvo inhibida en el grupo tratado con alopurinol. Gracias a este estudio, parece ser que el ejercicio está involucrado en la señalización por la vía del NF- κB . También se ha descrito que el ejercicio físico (80% $\text{VO}_{2\text{max}}$ durante 1 hora) terminaba activando al factor NF- κB en las células sanguíneas de hombres jóvenes físicamente activos (Vider, Laaksonen y cols. 2001). En el otro lado, nos encontramos un estudio que muestra como un ejercicio de fuerza de tipo excéntrico prolongado durante cuarenta y cinco minutos no alteró en absoluto la expresión de este factor nuclear (Buford, Cooke y cols. 2009). Por ello la influencia de diferentes tipos de ejercicio agudo y de entrenamiento en el estado redox en las diferentes células o tejidos del cuerpo permanece aun poco clara, lo que deja abierto un campo para continuar con la investigación (da Silva, Pinho y cols. 2009; Elosua, Molina y cols. 2003; Lambertucci, Levada-Pires y cols. 2007; Pinho, Andrades y cols. 2006; Powers y Criswell 1996).

LA MELATONINA COMO AYUDA ERGOGÉNICA EN EL EJERCICIO AGUDO

El ejercicio extenuante provoca una serie de alteraciones metabólicas que permiten la adaptación a una demanda energética aumentada. El principal sustrato que se utiliza cuando se produce dicha demanda es el glucógeno. Este se almacena principalmente tanto en el hígado como en el músculo esquelético, y mediante un conjunto de reacciones bioquímicas llamado glucogenolisis, se transforma en la principal fuente energética durante el ejercicio, la glucosa (Mazepa, Cuevas y cols. 2000). Por ello, las reservas de glucógeno disminuyen y los niveles de glucosa en sangre no se mantienen tras el ejercicio, lo que puede ser un factor a tener en cuenta a la hora de alcanzar el agotamiento (Maughan, Gleeson y cols. 1997).

En la última década se han estudiado diferentes parámetros que señalan importantes efectos de la melatonina relacionados con el rendimiento, como son las propiedades hipotérmicas (Atkinson, Drust y cols. 2003), la mejor utilización de sustratos energéticos como el glucógeno (Mazepa, Cuevas y cols. 2000) y la disminución de los marcadores de inflamación y de estrés oxidativo, gracias a su gran capacidad antioxidante (Ochoa, Diaz-Castro y cols. 2011).

En relación a la mejor utilización de sustratos energéticos, Mazepa y cols., observaron como la melatonina aumenta la utilización de lípidos durante el ejercicio y disminuye la utilización de hidratos de carbono. El ejercicio produjo hipoglucemia, aumento de los niveles de lactato y reducción del glucógeno muscular y hepático. Comparados con los animales que realizaron ejercicio sin tratamiento, los animales que realizaron ejercicio con 2,0 mg/Kg de melatonina tuvieron menores niveles de lactato plasmático y mayores niveles de glucógeno hepático y muscular. Indicaron que la melatonina mantiene las reservas de glucógeno en ratas en ejercicio a través de cambios en la utilización de lípidos e hidratos lo que puede resultar beneficioso para un mejor rendimiento en los ejercicios de resistencia (Mazepa, Cuevas y cols. 2000).

Por otro lado, la melatonina también reduce el tiempo que tardan los ácidos grasos libres almacenados en los adipocitos en alcanzar el torrente sanguíneo, y de este modo poder estar disponibles para ser el sustrato energético de las células (John, Beamish y cols. 1983).

Ambos procesos se ven complementados con el estudio que realizaron Kaya y cols. (2006) en el que se observó como la suplementación con melatonina, reducía los niveles de

lactato sanguíneo tras un ejercicio agotador. Este hecho, puede estar relacionado con la mejora de la eficiencia energética de la mitocondria o con la mayor disponibilidad de sustratos. En ambos casos, el resultado sería el mismo: un aumento del rendimiento físico, del mismo modo que hemos observado en los datos de nuestro estudio. Una de las posibles explicaciones a este fenómeno puede tener la base en una mejor utilización de los sustratos, favorecida por la administración de melatonina.

Sin embargo y como ya hemos explicado, los efectos de la melatonina durante el ejercicio pueden ser muchos otros.

Según nuestros análisis, el rendimiento de las ratas suplementadas con melatonina es claramente superior al grupo al que únicamente se le inyectó el vehículo. Estuvo realizando un ejercicio durante más tiempo, a más velocidad y recorriendo una distancia significativamente mayor. Todo esto unido a un consumo de oxígeno mucho mayor.

La idea clásica de que en la mitocondria, entre el 2% y el 5% de los electrones transportados no llegan al complejo IV, liberándose $\cdot O_2^-$ (Boveris, Oshino y cols. 1972; Cadenas, Boveris y cols. 1977; Frei 1994; St-Pierre, Buckingham y cols. 2002), nos haría suponer que cuanto mayor haya sido el consumo de oxígeno del animal, mayor cantidad de radicales libres se habrán liberado. Además el ejercicio extenuante induce la liberación de mieloperoxidasa por parte de los neutrófilos que acuden debido al daño muscular, haciéndose aún mayor la exposición a radicales libres y por tanto el daño generado (Morozov, Pryatkin y cols. 2003; Ortega, Ruiz y cols. 2006).

Por tanto los animales tratados con melatonina han realizado un esfuerzo significativamente mayor, ha habido una disminución del daño teórico por parte de la melatonina. Estos resultados concuerdan con otros que también han evidenciado efectos semejantes de la melatonina sobre el estrés oxidativo producido por el ejercicio físico intenso. Hay gran variedad de estudios que confirman esta hipótesis, aunque ninguno que haya realizado los mismos protocolos o haya utilizado las mismas dosis, aunque en todos los modelos experimentales conocidos la melatonina mostró capacidad como agente antioxidante (Reiter, Tan y cols. 2003).

Kumar y cols. compararon los efectos del ejercicio intenso sobre dos grupos (uno con melatonina y otro con placebo) y evidenciaron una reducción de la peroxidación lipídica, un aumento de la capacidad antioxidante total, y un mantenimiento de la actividad de la SOD, GPX (enzima glutatión peroxidasa) y CAT estadísticamente significativo en el grupo

experimental que tomaba melatonina, frente al grupo control (Kumar y Naidu 2002).

En otro estudio reciente en el que se compararon los efectos de una carrera que combinaba la ultra-resistencia con un esfuerzo mecánico por parte del músculo muy alto, la suplementación con melatonina logró un nivel de peroxidación lipídica significativamente menor que en el grupo que recibió placebo. También se evidenció un aumento de la actividad antioxidante de las enzimas GPx y CAT mediado, según los autores, por la acción de la melatonina. Esta molécula actúa tanto como antioxidante como induciendo una mayor actividad de las citadas enzimas (Ochoa, Diaz-Castro y cols. 2011). También se observó una menor activación del factor nuclear κ B en el grupo suplementado.

En un estudio sobre ciclistas que participaban en una competición de 4 días, Serrano y cols. analizaron los marcadores tanto de estrés oxidativo como de inflamación. La peroxidación lipídica y algunas citoquinas, como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), aumentaron tras el ejercicio. Pero también lo hizo la melatonina generada de manera endógena, quizá como mecanismo de protección (Serrano, Venegas y cols. 2010), por lo que la administración exógena complementa la acción de la endógena.

Otro estudio, esta vez en ratas Wistar, demostró que un ejercicio intenso incrementó las concentraciones de mieloperoxidasa y de TNF α , IL-1, IL-6. Todos estos marcadores están relacionados con un incremento del daño por radicales libres y son marcadores de inflamación. También aparecieron elevadas la iNOS, y la COX2, junto con una mayor activación del NF κ B, lo que sugiere que el ejercicio muy intenso tiene efectos dañinos sobre las estructuras musculares. Sin embargo, en el grupo al que se administró melatonina intraperitoneal estos efectos aparecen total o parcialmente inhibidos, lo que sugiere que esta indolamina posee efectos antioxidantes y antiinflamatorios, seguramente porque inhibe la activación de la vía de transducción celular NF κ B (Veneroso, Tunon y cols. 2009).

Como se comentaba previamente, todos estos estudios confirman la teoría de que la suplementación con melatonina provoca un efecto ergogénico. Por dos posible mecanismos que no tienen porque ser excluyentes: la mejor utilización de los sustratos energéticos, por lo que se retrasaría la aparición de fatiga, o bien por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, que preservarían las estructuras celulares del daño oxidativo, manteniendo así su función.

COMENTARIO FINAL

Para finalizar la discusión de nuestros resultados, debemos incidir en un punto fundamental, se ha visto una paradoja acerca de la influencia del ejercicio físico en la sangre de hombres sanos no entrenados. Al mismo tiempo que observamos, tras diferentes protocolos de ejercicio agudo, mayores niveles de daño oxidativo, se observa un aumento en las defensas antioxidantes.

Existe un debate abierto sobre los beneficios o perjuicios del ejercicio en relación al estrés oxidativo (Ji 2001). Hemos descrito como el ejercicio físico realizado de manera tanto máxima como submáxima, reduce la fluidez de las membranas de eritrocitos de dichos sujetos, lo que unido al aumento de la carbonilación proteica en el plasma aporta argumentos razonables para pensar que la sobreproducción de radicales libres que genera el ejercicio provoca cambios en la dinámica de la bicapa lipídica de eritrocitos.

Sin embargo surge la paradoja cuando los mismos protocolos de ejercicio, muestran otra evidencia de que la realización de un ejercicio de manera aislada, independientemente de si es máximo o submáximo, aumenta la actividad antioxidante total del plasma sanguíneo en humanos sanos. Este aumento puede ser consecuencia de la mejora de las actividades enzimáticas de CAT, GPx, GR y SOD. Se ha descrito como los diferentes tipos de esfuerzo físico aumentaban la actividad de dichas enzimas, lo que sin duda contribuye a la TAS. De este modo, podemos afirmar que basándonos en nuestras observaciones y en estudios previos acerca de este tema, en los que se ve como el ejercicio provoca un incremento de las concentraciones de algunos antioxidantes, que sean las interacciones con los radicales libres que se han producido en exceso las que regulen la expresión de determinadas enzimas y modulen su actividad (Ferreira, Bacurau y cols. 2010; Serrano, Venegas y cols. 2010). Nos parece pues razonable, proponer que el ejercicio juegue un papel beneficioso para la salud debido a su capacidad para incrementar los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo mediante, paradójicamente, la inducción de dicho estrés oxidativo.

Por otro lado, hay ejercicios muy intensos que producen un daño que limita la función celular, haciendo que el rendimiento sea menor y la recuperación más lenta (Ochoa, Diaz-Castro y cols. 2011). Por las propiedades que hemos descrito, la melatonina es un buen candidato para ser administrado de manera exógena en situaciones de ejercicio extenuante.

Esfuerzo físico agudo, estrés oxidativo y melatonina

Primero por sus propiedades protectoras frente al daño durante y después el ejercicio, lo que favorecerá la recuperación del sujeto. Y segundo, por su efecto ergogénico, ya que favorece la movilización de lípidos y conservación de los depósitos de glucógeno, además de mejorar la eficiencia energética de las mitocondrias (Mazepa, Cuevas y cols. 2000).

CONCLUSIONES

1. El ejercicio físico agudo en voluntarios sanos, aumentó parámetros sanguíneos de estrés oxidativo a la vez que incrementó los niveles de defensa antioxidante.
2. El esfuerzo agudo máximo y submáximo, no modificó significativamente la lipoperoxidación pero sí aumentó el daño oxidativo a proteínas sanguíneas.
3. La mayor producción de radicales libres asociada al esfuerzo físico, provocó disminución de la fluidez de membrana eritrocitaria, con diferencias significativas respecto al control.
4. El ejercicio agudo aumentó la actividad total antioxidante del plasma y las actividades de las enzimas séricas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y peroxidasa.
5. La administración de melatonina a ratas, aumentó su rendimiento físico con mayores distancias recorridas, velocidad máxima y consumo de oxígeno alcanzados.
6. La melatonina mostró un alto valor ergogénico, pudiendo mejorar las defensas frente al estrés oxidativo asociado al esfuerzo físico. En humanos, la ingesta de melatonina podría aumentar el rendimiento deportivo y paliar efectos adversos del ejercicio físico extenuante.

CONCLUSIONS

1. This research reviewed the scientific evidence of oxidative damage and antioxidant defences in healthy volunteers who did both maximal and submaximal ergometries. It evaluated the effect of melatonin administration in sport performance and the level of oxidative stress generated after exhaustive exercise.
2. It has proved that acute exercise, carried out with maximal or submaximal effort, increased oxidative damage to plasma proteins, without significant alteration to the oxidative damage to blood lipids.
3. The overproduction of free radicals associated to physical effort provokes a reduction of erythrocyte membrane fluidity, significantly different from control group.
4. The total plasma antioxidant activity and that of catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and peroxidase enzymes increased after acute exercise.
5. Melatonin was shown to have high ergogenic capacity, as it improved physical performance during acute exercise, when the ergometry values in an animal test, such as the distance, the maximum speed and oxygen consumption were increased.
6. Melatonin consumption may protect against adverse effects due to sport induced oxidative stress, and lead to higher antioxidant defence. This would be beneficial in sport performance as well as a healthy habit to improve quality of life.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M., R. J. Reiter y cols. (1994). "Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: evidence for an antioxidative role for melatonin." J Pineal Res **17**(2): 94-100.
- Acuña-Castroviejo, D., G. Escames y cols. (2003). "Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites." Adv Exp Med Biol **527**: 549-57.
- Acuña-Castroviejo, D., G. Escames y cols. (2005). "Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis." Endocrine **27**(2): 159-68.
- Acuña-Castroviejo, D., M. Martín y cols. (2001). "Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics." J Pineal Res **30**(2): 65-74.
- Acuña-Castroviejo, D., M. I. Pablos y cols. (1993). "Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **82**(2): 253-6.
- Aebi, H. E. (1983). Catalase. Methods of enzymatic analysis. H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer y M. Grassl. Weinheim ; Deerfield Beach, Fla., Verlag Chemie: 273-286.
- Aguilo, A., P. Tauler y cols. (2005). "Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise." Physiol Behav **84**(1): 1-7.
- Aizawa, S., H. Tokura y cols. (2002). "The administration of exogenous melatonin during the daytime lowers the thermoregulatory setpoint in humans." Journal of Thermal Biology **27**(2): 115-119.
- Ajmani, R. S., J. L. Fleg y cols. (2003). "Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise." Clin Hemorheol Microcirc **28**(1): 29-40.
- Albertini, R., S. Rindi y cols. (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." Arch Biochem Biophys **327**(2): 209-14.
- Alessio, H. M. y A. H. Goldfarb (1988). "Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training." J Appl Physiol **64**(4): 1333-6.
- Alessio, H. M., A. E. Hagerman y cols. (2000). "Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise." Med Sci Sports Exerc **32**(9): 1576-81.
- Alonso, M., P. S. Collado y cols. (2006). "Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle." J Pineal Res **41**(1): 8-14.
- Alleyne, T. A., M. T. Wilson y cols. (1992). "Investigation of the electron-transfer properties of cytochrome c oxidase covalently cross-linked to Fe- or Zn-containing cytochrome c." Biochem J **287** (Pt 3): 951-6.
- American College of Sports, M., J. L. Roitman y cols. (2001). ACSM's resource manual for Guidelines for exercise testing and prescription. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga y cols. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-22.
- Anderson, E. J. y P. D. Neuffer (2006). "Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation." Am J Physiol Cell Physiol **290**(3): C844-51.
- Anson, R. M., P. A. Mason y cols. (2006). "Gene-specific and mitochondrial repair of oxidative DNA damage." Methods Mol Biol **314**: 155-81.
- Antolin, I., J. C. Mayo y cols. (2002). "Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease." Brain Res **943**(2): 163-73.
- Antolin, I., C. Rodriguez y cols. (1996). "Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes." FASEB J **10**(8): 882-90.
- Anton-Tay, F., G. Ramirez y cols. (1998). "In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin." Neurochem Res **23**(5): 601-6.

- Anzueto, A., F. H. Andrade y cols. (1992). "Resistive breathing activates the glutathione redox cycle and impairs performance of rat diaphragm." J Appl Physiol **72**(2): 529-34.
- Appenzeller, O. y S. C. Wood (1992). "Peptides and exercise at high and low altitudes." Int J Sports Med **13 Suppl 1**: S135-40.
- Arendt, J., A. M. Symons y cols. (1981). "Pineal function in the sheep: evidence for a possible mechanism mediating seasonal reproductive activity." Experientia **37**(6): 584-6.
- Arner, E. S. y A. Holmgren (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." Eur J Biochem **267**(20): 6102-9.
- Aslan, M. y T. Ozben (2003). "Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways." Antioxid Redox Signal **5**(6): 781-8.
- Atkinson, G., P. Buckley y cols. (2001). "Are there hangover-effects on physical performance when melatonin is ingested by athletes before nocturnal sleep?" Int J Sports Med **22**(3): 232-4.
- Atkinson, G., B. Drust y cols. (2003). "The relevance of melatonin to sports medicine and science." Sports Med **33**(11): 809-31.
- Atkinson, G., A. Holder y cols. (2005). "Effects of melatonin on the thermoregulatory responses to intermittent exercise." J Pineal Res **39**(4): 353-9.
- Atkinson, G., H. Jones y cols. (2005). "Effects of daytime ingestion of melatonin on short-term athletic performance." Ergonomics **48**(11-14): 1512-22.
- Avery, N. G., J. L. Kaiser y cols. (2003). "Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise." J Strength Cond Res **17**(4): 801-9.
- Babior, B. M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts)." N Engl J Med **298**(12): 659-68.
- Badia, P., B. Myers y cols. (1993). Melatonin and thermoregulation. Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical applications. B. P. Yu y R. Reiter. Boca Raton, CRC Press: 349-364.
- Bai, J. y A. I. Cederbaum (2001). "Mitochondrial catalase and oxidative injury." Biol Signals Recept **10**(3-4): 189-99.
- Baker, F. C., J. I. Waner y cols. (2001). "Sleep and 24 hour body temperatures: a comparison in young men, naturally cycling women and women taking hormonal contraceptives." J Physiol **530**(Pt 3): 565-74.
- Baker, J. S., D. M. Bailey y cols. (2004). "Metabolic implications of resistive force selection for oxidative stress and markers of muscle damage during 30 s of high-intensity exercise." Eur J Appl Physiol **92**(3): 321-7.
- Balon, T. W. y J. L. Nadler (1994). "Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations." J Appl Physiol **77**(6): 2519-21.
- Barclay, J. K. y M. Hansel (1991). "Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue." Can J Physiol Pharmacol **69**(2): 279-84.
- Barlow-Walden, L. R., R. J. Reiter y cols. (1995). "Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity." Neurochem Int **26**(5): 497-502.
- Becker-Andre, M., I. Wiesenbergl y cols. (1994). "Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily." J Biol Chem **269**(46): 28531-4.
- Becker, B. F., N. Reinholz y cols. (1989). "Uric acid as radical scavenger and antioxidant in the heart." Pflugers Arch **415**(2): 127-35.
- Beckman, J. S. y W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-37.
- Beckman, K. B. y B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiol Rev **78**(2): 547-81.
- Beckmann, J. S., Y. Z. Ye y cols. (1994). "Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry." Biol Chem Hoppe Seyler **375**(2): 81-8.
- Berne, R. M., M. N. Levy y cols. (2009). Fisiología. Barcelona, Elsevier España.

- Biesalski, H. K., C. Hemmes y cols. (1996). "Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of beta-carotene." Free Radic Res **24**(3): 215-24.
- Bishop, D. (2003). "Warm up I: potential mechanisms and the effects of passive warm up on exercise performance." Sports Med **33**(6): 439-54.
- Blickenstaff, R. T., S. M. Brandstadter y cols. (1994). "Potential radioprotective agents. 1. Homologs of melatonin." J Pharm Sci **83**(2): 216-8.
- Bloomer, R. J., P. G. Davis y cols. (2007). "Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women." Int J Sports Med **28**(1): 21-5.
- Bloomer, R. J., M. J. Falvo y cols. (2006). "Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints." Med Sci Sports Exerc **38**(8): 1436-42.
- Bloomer, R. J. y K. H. Fisher-Wellman (2008). "Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake." Gend Med **5**(3): 218-28.
- Bosca, L., M. Zeini y cols. (2005). "Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate." Toxicology **208**(2): 249-58.
- Boulant, J. A. (1998). "Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature." Ann N Y Acad Sci **856**: 108-15.
- Boveris, A. y B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-16.
- Boveris, A., N. Oshino y cols. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." Biochem J **128**(3): 617-30.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brady, P. S., L. J. Brady y cols. (1979). "Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat." J Nutr **109**(6): 1103-9.
- Bredt, D. S., C. E. Glatt y cols. (1991). "Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase." Neuron **7**(4): 615-24.
- Breen, A. P. y J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Radic Biol Med **18**(6): 1033-77.
- Brown, K. M. y J. R. Arthur (2001). "Selenium, selenoproteins and human health: a review." Public Health Nutr **4**(2B): 593-9.
- Bruch, R. C. y W. S. Thayer (1983). "Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes." Biochim Biophys Acta **733**(2): 216-22.
- Bryant, R. J., J. Ryder y cols. (2003). "Effects of vitamin E and C supplementation either alone or in combination on exercise-induced lipid peroxidation in trained cyclists." J Strength Cond Res **17**(4): 792-800.
- Brzeczczynska, J. y K. Gwozdziński (2008). "Nitric oxide induced oxidative changes in erythrocyte membrane components." Cell Biol Int **32**(1): 114-20.
- Brzeczczynska, J., A. Pieniazek y cols. (2008). "Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise." Appl Physiol Nutr Metab **33**(6): 1223-31.
- Buettner, G. R. y B. A. Jurkiewicz (1996). "Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid." Radiat Res **145**(5): 532-41.
- Buford, T. W., M. B. Cooke y cols. (2009). "Effects of eccentric treadmill exercise on inflammatory gene expression in human skeletal muscle." Appl Physiol Nutr Metab **34**(4): 745-53.
- Burton, G. W. y K. U. Ingold (1984). "beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant." Science **224**(4649): 569-73.

- Burton, G. W., A. Joyce y cols. (1982). "First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma." Lancet **2**(8293): 327.
- Butterfield, T. A., T. M. Best y cols. (2006). "The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair." J Athl Train **41**(4): 457-65.
- Buxton, O. M., M. L'Hermite-Baleriaux y cols. (1997). "Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion." J Biol Rhythms **12**(6): 568-74.
- Cadenas, E., A. Boveris y cols. (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." Arch Biochem Biophys **180**(2): 248-57.
- Cagnacci, A., J. A. Elliott y cols. (1992). "Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans." J Clin Endocrinol Metab **75**(2): 447-52.
- Cagnacci, A., K. Krauchi y cols. (1997). "Homeostatic versus circadian effects of melatonin on core body temperature in humans." J Biol Rhythms **12**(6): 509-17.
- Cagnacci, A., R. Soldani y cols. (1996). "Modification of circadian body temperature rhythm during the luteal menstrual phase: role of melatonin." J Appl Physiol **80**(1): 25-9.
- Cagnacci, A., R. Soldani y cols. (1994). "Melatonin-induced decrease of body temperature in women: a threshold event." Neuroendocrinology **60**(5): 549-52.
- Cagnacci, A., R. Soldani y cols. (1995). "Melatonin enhances cortisol levels in aged but not young women." Eur J Endocrinol **133**(6): 691-5.
- Caputo, F. y B. S. Denadai (2004). "Effects of aerobic endurance training status and specificity on oxygen uptake kinetics during maximal exercise." Eur J Appl Physiol **93**(1-2): 87-95.
- Carr, D. B., S. M. Reppert y cols. (1981). "Plasma melatonin increases during exercise in women." J Clin Endocrinol Metab **53**(1): 224-5.
- Carta, P., G. Aru y cols. (1991). "Bicycle ergometry exercise tests: a comparison between 3 protocols with an increasing load." Med Lav **82**(1): 56-64.
- Cases, N., A. Sureda y cols. (2006). "Response of antioxidant defences to oxidative stress induced by prolonged exercise: antioxidant enzyme gene expression in lymphocytes." Eur J Appl Physiol **98**(3): 263-9.
- Cazzola, R., S. Russo-Volpe y cols. (2003). "Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls." Eur J Clin Invest **33**(10): 924-30.
- Cimen, M. Y. (2008). "Free radical metabolism in human erythrocytes." Clin Chim Acta **390**(1-2): 1-11.
- Coombes, J. S., B. Rowell y cols. (2002). "Effects of vitamin E deficiency on fatigue and muscle contractile properties." Eur J Appl Physiol **87**(3): 272-7.
- Cooper, C. E., N. B. Vollaard y cols. (2002). "Exercise, free radicals and oxidative stress." Biochem Soc Trans **30**(2): 280-5.
- Cooper, T. G. y D. W. Hamilton (1977). "Phagocytosis of spermatozoa in the terminal region and gland of the vas deferens of the rat." Am J Anat **150**(2): 247-67.
- Coreil, J., C. A. Bryant y cols. (2001). Health behavior in developing countries. Social and behavioral foundations of public health. J. Coreil, C. A. Bryant, J. N. Henderson, M. S. Forthofer y G. P. Quinn. Thousand Oaks [etc.], Sage Publications: XVI, 360 p.
- Coto-Montes, A. y R. Hardeland (1999). "Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase." J Pineal Res **27**(3): 154-8.
- Crespo, E., M. Macias y cols. (1999). "Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced

- multiple organ dysfunction syndrome in rats." FASEB J **13**(12): 1537-46.
- Criswell, D., S. Powers y cols. (1993). "High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity." Med Sci Sports Exerc **25**(10): 1135-40.
- Cross, A. R. y O. T. Jones (1991). "Enzymic mechanisms of superoxide production." Biochim Biophys Acta **1057**(3): 281-98.
- Curtis, M. T., D. Gilfor y cols. (1984). "Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes." Arch Biochem Biophys **235**(2): 644-9.
- Chance, B., H. Sies y cols. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.
- Cheeseman, K. H. y T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." Br Med Bull **49**(3): 481-93.
- Chen, J. J. y B. P. Yu (1994). "Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products." Free Radic Biol Med **17**(5): 411-8.
- Chen, J. S., C. Sensini y cols. (2000). "Ascorbic acid induces spectrin reorganization in bull epididymal spermatozoa." Cell Biol Toxicol **16**(2): 77-82.
- Cherednichenko, G., A. V. Zima y cols. (2004). "NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release." Circ Res **94**(4): 478-86.
- Chevion, S., D. S. Moran y cols. (2003). "Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5119-23.
- Chiarugi, P., G. Pani y cols. (2003). "Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion." J Cell Biol **161**(5): 933-44.
- Child, R. B., D. M. Wilkinson y cols. (1998). "Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run." Med Sci Sports Exerc **30**(11): 1603-7.
- Childs, A., C. Jacobs y cols. (2001). "Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise." Free Radic Biol Med **31**(6): 745-53.
- Chuang, J. I., N. Mohan y cols. (1996). "Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen." Cell Biol Int **20**(10): 687-92.
- da Silva, L. A., C. A. Pinho y cols. (2009). "Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver." Appl Physiol Nutr Metab **34**(1): 60-5.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi y cols. (2001). "The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself." Free Radic Biol Med **31**(12): 1624-32.
- Davies, K. J. y A. L. Goldberg (1987). "Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes." J Biol Chem **262**(17): 8220-6.
- Davies, K. J., J. J. Maguire y cols. (1982). "Muscle mitochondrial bioenergetics, oxygen supply, and work capacity during dietary iron deficiency and repletion." Am J Physiol **242**(6): E418-27.
- Davies, K. J., A. T. Quintanilha y cols. (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-205.
- Davies, K. J., A. Sevanian y cols. (1986). "Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid." Biochem J **235**(3): 747-54.
- Davies, M. J. (2003). "Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 761-70.
- Dawson, B., G. J. Henry y cols. (2002). "Effect of Vitamin C and E supplementation on biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after a 21 km run." Int J Sports Med **23**(1): 10-5.

- Dawson, D., S. Gibbon y cols. (1996). "The hypothermic effect of melatonin on core body temperature: is more better?" J Pineal Res **20**(4): 192-7.
- Dawson, D. y C. J. van den Heuvel (1998). "Integrating the actions of melatonin on human physiology." Ann Med **30**(1): 95-102.
- de Grey, A. D. (2003). "A hypothesis for the minimal overall structure of the mammalian plasma membrane redox system." Protoplasma **221**(1-2): 3-9.
- De Moffarts, B., K. Portier y cols. (2007). "Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses." Vet J **174**(1): 113-21.
- Deacon, S. y J. Arendt (1995). "Melatonin-induced temperature suppression and its acute phase-shifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans." Brain Res **688**(1-2): 77-85.
- Dean, R. T., S. Fu y cols. (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation." Biochem J **324** (Pt 1): 1-18.
- Decker, J. F. y W. B. Quay (1982). "Stimulatory effects of melatonin on ependymal epithelium of choroid plexuses in golden hamsters." J Neural Transm **55**(1): 53-67.
- Dellegar, S. M., S. A. Murphy y cols. (1999). "Identification of the factors affecting the rate of deactivation of hypochlorous acid by melatonin." Biochem Biophys Res Commun **257**(2): 431-9.
- Derby, M. C. y P. A. Gleeson (2007). "New insights into membrane trafficking and protein sorting." Int Rev Cytol **261**: 47-116.
- Díaz, P. T., E. Brownstein y cols. (1994). "Effects of N-acetylcysteine on in vitro diaphragm function are temperature dependent." J Appl Physiol **77**(5): 2434-9.
- Diliberto, E. J., Jr., A. J. Daniels y cols. (1991). "Multicompartmental secretion of ascorbate and its dual role in dopamine beta-hydroxylation." Am J Clin Nutr **54**(6 Suppl): 1163S-1172S.
- Dillard, C. J., R. E. Litov y cols. (1978). "Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation." J Appl Physiol **45**(6): 927-32.
- Dobretsov, G. E., T. A. Borschevskaya y cols. (1977). "The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation." FEBS Lett **84**(1): 125-8.
- Dollins, A. B., H. J. Lynch y cols. (1993). "Effect of pharmacological daytime doses of melatonin on human mood and performance." Psychopharmacology (Berl) **112**(4): 490-6.
- Ducrocq, C., B. Blanchard y cols. (1999). "Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent." Cell Mol Life Sci **55**(8-9): 1068-77.
- Dumas, D., S. Muller y cols. (1997). "Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched erythrocyte membrane." Arch Biochem Biophys **341**(1): 34-9.
- Dumaswala, U. J., L. Zhuo y cols. (1999). "Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 1041-9.
- Dutta-Roy, A. K., T. K. Ray y cols. (1985). "Control of erythrocyte membrane microviscosity by insulin." Biochim Biophys Acta **816**(1): 187-90.
- Eichner, E. R. (1985). "Runner's macrocytosis: a clue to footstrike hemolysis. Runner's anemia as a benefit versus runner's hemolysis as a detriment." Am J Med **78**(2): 321-5.
- Elfering, S. L., T. M. Sarkela y cols. (2002). "Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **277**(41): 38079-86.
- Elosua, R., L. Molina y cols. (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." Atherosclerosis **167**(2): 327-34.
- Escames, G., D. Acuna-Castroviejo y cols. (2006). "Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence." J Pharm Pharmacol **58**(9): 1153-65.

- Escames, G., J. M. Guerrero y cols. (1997). "Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates." Neurosci Lett **230**(3): 147-50.
- Escames, G., J. Leon y cols. (2003). "Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats." FASEB J **17**(8): 932-4.
- Espinosa, A., A. Leiva y cols. (2006). "Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited Ca²⁺ stimulates ERK, CREB, early genes." J Cell Physiol **209**(2): 379-88.
- Esterbauer, H. y K. H. Cheeseman (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods Enzymol **186**: 407-21.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur y cols. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**(1): 81-128.
- Fattman, C. L., L. M. Schaefer y cols. (2003). "Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine." Free Radic Biol Med **35**(3): 236-56.
- Fenton, H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." J Chem Soc Trans **65**.
- Ferreira, J. C., A. V. Bacurau y cols. (2010). "Aerobic exercise training improves Ca²⁺ handling and redox status of skeletal muscle in mice." Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.) **235**(4): 497-505.
- Ferrer, M. D., P. Tauler y cols. (2009). "Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise." J Sports Sci **27**(1): 49-58.
- Finaud, J., G. Lac y cols. (2006). "Oxidative stress: relationship with exercise and training." Sports Med **36**(4): 327-58.
- Fischkoff, S. y J. M. Vanderkooi (1975). "Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene." J Gen Physiol **65**(5): 663-76.
- Flohe, L. y W. A. Gunzler (1984). "Assays of glutathione peroxidase." Methods Enzymol **105**: 114-21.
- Flohe, L., W. A. Gunzler y cols. (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." FEBS Lett **32**(1): 132-4.
- Fortney, S. M. y N. B. Vroman (1985). "Exercise, performance and temperature control: temperature regulation during exercise and implications for sports performance and training." Sports Med **2**(1): 8-20.
- Fraga, C. G., M. K. Shigenaga y cols. (1990). "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4533-7.
- Fraschini, F., A. Cesarani y cols. (1999). "Melatonin influences human balance." Biol Signals Recept **8**(1-2): 111-9.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action." Am J Med **97**(3A): 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Fridovich, I. (1978). "Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle." Photochem Photobiol **28**(4-5): 733-41.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." Annu Rev Biochem **64**: 97-112.
- Fukai, T., R. J. Folz y cols. (2002). "Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease." Cardiovasc Res **55**(2): 239-49.
- Fukuzawa, K., H. Chida y cols. (1981). "Antioxidative effect of alpha-tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid-Fe²⁺-induced lipid peroxidation." Arch Biochem Biophys **206**(1): 173-80.
- Funes, L., L. Carrera-Quintanar y cols. (2010). "Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils' oxidative stress in chronic exercise." Eur J Appl Physiol.
- Gaeini, A. A., N. Rahnema y cols. (2006). "Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress at rest and after exercise to

- exhaustion in athletic students." J Sports Med Phys Fitness **46**(3): 458-61.
- Gago-Dominguez, M., X. Jiang y cols. (2007). "Lipid peroxidation and the protective effect of physical exercise on breast cancer." Med Hypotheses **68**(5): 1138-43.
- García, J. J., R. J. Reiter y cols. (1999). "Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress." J Bioenerg Biomembr **31**(6): 609-16.
- García Morales, M. C. (2007). Efectos de la melatonina, coenzima Q10 y Phlebodium Decumanum sobre el estrés oxidativo en el ejercicio físico intenso. Departamento de Enfermería. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Granada, Univerisdad de Granada: 322.
- Garzetti, G. G., A. L. Tranquilli y cols. (1993). "Altered lipid composition, increased lipid peroxidation, and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage in preeclampsia." Obstet Gynecol **81**(3): 337-40.
- Gerster, H. (1999). "High-dose vitamin C: a risk for persons with high iron stores?" Int J Vitam Nutr Res **69**(2): 67-82.
- Getchell, L. H. y J. C. Moore (1975). "Physical training: comparative responses of middle-aged adults." Arch Phys Med Rehabil **56**(6): 250-4.
- Ghosh, M. K., M. Mukhopadhyay y cols. (1997). "NADPH-initiated cytochrome P450-dependent free iron-independent microsomal lipid peroxidation: specific prevention by ascorbic acid." Mol Cell Biochem **166**(1-2): 35-44.
- Giguere, V., M. Tini y cols. (1994). "Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors." Genes Dev **8**(5): 538-53.
- Gilad, E., S. Cuzzocrea y cols. (1997). "Melatonin is a scavenger of peroxynitrite." Life Sci **60**(10): PL169-74.
- Gilbert, S. S., C. J. van den Heuvel y cols. (1999). "Daytime melatonin and temazepam in young adult humans: equivalent effects on sleep latency and body temperatures." J Physiol **514** (Pt 3): 905-14.
- Giusti, P., M. Gusella y cols. (1995). "Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainate but not from N-methyl-D-aspartate excitotoxicity." Exp Neurol **131**(1): 39-46.
- Goeptar, A. R., H. Scheerens y cols. (1995). "Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450." Crit Rev Toxicol **25**(1): 25-65.
- Goldberg, D. M. y R. J. Spooner (1983). Glutathione Reductase. Methods of enzymatic analysis. H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer y M. Grassl. Weinheim ; Deerfield Beach, Fla., Verlag Chemie. **3**: 258-266.
- Goldfarb, A. H., M. K. McIntosh y cols. (1994). "Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats." J Appl Physiol **76**(4): 1630-5.
- Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech y cols. (2008). "Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training." Free Radic Biol Med **44**(2): 126-31.
- Gomez-Cabrera, M. C., F. V. Pallardo y cols. (2003). "Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France." JAMA **289**(19): 2503-4.
- Gong, M. C., S. Arbogast y cols. (2006). "Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells." J Appl Physiol **100**(2): 399-405.
- Gonzalez-Alonso, J., C. Teller y cols. (1999). "Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat." J Appl Physiol **86**(3): 1032-9.
- Granger, D. N., G. Rutili y cols. (1981). "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia." Gastroenterology **81**(1): 22-9.
- Green, D. J., A. Maiorana y cols. (2004). "Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans." J Physiol **561**(Pt 1): 1-25.

- Green, H. J., J. R. Sutton y cols. (1991). "Response of red cell and plasma volume to prolonged training in humans." J Appl Physiol **70**(4): 1810-5.
- Greenwald, R. A. y W. W. Moy (1980). "Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid." Arthritis Rheum **23**(4): 455-63.
- Gregory, E. M. y I. Fridovich (1973). "Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen." J Bacteriol **114**(2): 543-8.
- Grisham, M. B., D. Jourdain y cols. (1999). "Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): G315-21.
- Grootveld, M., E. B. Henderson y cols. (1991). "Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy." Biochem J **273**(Pt 2): 459-67.
- Groussard, C., F. Rannou-Bekono y cols. (2003). "Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise." Eur J Appl Physiol **89**(1): 14-20.
- Guerrero, J. M. y R. J. Reiter (2002). "Melatonin-immune system relationships." Curr Top Med Chem **2**(2): 167-79.
- Gutteridge, J. M. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." Clin Chem **41**(12 Pt 2): 1819-28.
- Gutteridge, J. M. y B. Halliwell (1989). "Iron toxicity and oxygen radicals." Baillieres Clin Haematol **2**(2): 195-256.
- Guyton, A. C. y J. E. Hall (2006). Textbook of medical physiology. Edinburgh, Elsevier Saunders ; Oxford : Elsevier Science [distributor].
- Haber, F. y J. Weiss (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." Proc R Soc London **147**: 332-351.
- Halliwell, B. (1990). "How to characterize a biological antioxidant." Free Radic Res Commun **9**(1): 1-32.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease." Am J Med **91**(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1993). "The chemistry of free radicals." Toxicol Ind Health **9**(1-2): 1-21.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" Lancet **344**(8924): 721-4.
- Halliwell, B., R. Aeschbach y cols. (1995). "The characterization of antioxidants." Food Chem Toxicol **33**(7): 601-17.
- Halliwell, B. y J. M. Gutteridge (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." Arch Biochem Biophys **280**(1): 1-8.
- Halliwell, B. y J. M. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol **186**: 1-85.
- Halliwell, B. y J. M. C. Gutteridge (2007). Free radicals in biology and medicine. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- Hammeren, J., S. Powers y cols. (1992). "Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats." Int J Sports Med **13**(5): 412-6.
- Hanahan, D. J. y J. E. Ekholm (1974). "The preparation of red cell ghosts (membranes)." Methods Enzymol **31**(Pt A): 168-72.
- Hara, M., M. Abe y cols. (1996). "Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin." Pharmacol Toxicol **78**(5): 308-12.
- Hardeland, R. (2005). "Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance." Endocrine **27**(2): 119-30.
- Hardeland, R. (2008). "Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites." Cell Mol Life Sci **65**(13): 2001-18.

- Hardeland, R. (2009). "Neuroprotection by radical avoidance: search for suitable agents." Molecules **14**(12): 5054-102.
- Hardeland, R., A. Coto-Montes y cols. (2003). "Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms." Chronobiol Int **20**(6): 921-62.
- Hardeland, R., B. Poeggeler y cols. (2003). "Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage." J Pineal Res **34**(1): 17-25.
- Harman, D. (1972). "The biologic clock: the mitochondria?" J Am Geriatr Soc **20**(4): 145-7.
- Harris, E. D. (1992). "Copper as a cofactor and regulator of copper,zinc superoxide dismutase." J Nutr **122**(3 Suppl): 636-40.
- Hatao, H., S. Oh-ishi y cols. (2006). "Effects of acute exercise on lung antioxidant enzymes in young and old rats." Mech Ageing Dev **127**(4): 384-90.
- Headlam, H. A. y M. J. Davies (2003). "Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals." Free Radic Biol Med **34**(1): 44-55.
- Hermansen, L. y M. Wachtlova (1971). "Capillary density of skeletal muscle in well-trained and untrained men." J Appl Physiol **30**(6): 860-3.
- Heron, D. S., M. Shinitzky y cols. (1980). "Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7463-7.
- Heunks, L. M., H. A. Machiels y cols. (2001). "Free radicals in hypoxic rat diaphragm contractility: no role for xanthine oxidase." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(6): L1402-12.
- Hickson, R. C., C. Kanakis, Jr. y cols. (1982). "Reduced training duration effects on aerobic power, endurance, and cardiac growth." J Appl Physiol **53**(1): 225-9.
- Hidalgo, C., G. Sanchez y cols. (2006). "A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S - glutathionylation." J Biol Chem **281**(36): 26473-82.
- Higuchi, M., L. J. Cartier y cols. (1985). "Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise." J Gerontol **40**(3): 281-6.
- Hill, A. V., C. N. H. Long y cols. (1924). "Muscular Exercise, Lactic Acid, and the Supply and Utilisation of Oxygen." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character **97**(681): 84-138.
- Hirose, T., R. J. Smith y cols. (1994). "ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle." Biochem Biophys Res Commun **205**(3): 1976-83.
- Hirschfield, W., M. R. Moody y cols. (2000). "Nitric oxide release and contractile properties of skeletal muscles from mice deficient in type III NOS." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(1): R95-R100.
- Hodgson, E. (2004). A textbook of modern toxicology. Hoboken, N.J., John Wiley.
- Hofman, M. A. y D. F. Swaab (1993). "Diurnal and seasonal rhythms of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of humans." J Biol Rhythms **8**(4): 283-95.
- Holmgren, A. (1989). "Thioredoxin and glutaredoxin systems." J Biol Chem **264**(24): 13963-6.
- Holloszy, J. O. y E. F. Coyle (1984). "Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences." J Appl Physiol **56**(4): 831-8.
- Hopkins, F. G. y K. A. C. Elliott (1931). "The Relation of Glutathione to Cell Respiration with Special Reference to Hepatic Tissue " Proc Roy Soc London **109**(760): 58-88.
- Houslay, M. D. (1985). "Regulation of adenylate cyclase (EC 4.6.1.1) activity by its lipid environment." Proc Nutr Soc **44**(2): 157-65.
- Howell, R. R. y J. B. Wyngaarden (1960). "On the mechanism of peroxidation of uric acids by hemoproteins." J Biol Chem **235**: 3544-50.

- Huerto-Delgadillo, L., F. Anton-Tay y cols. (1994). "Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist." J Pineal Res **17**(2): 55-62.
- Hughes, R. J. y P. Badia (1997). "Sleep-promoting and hypothermic effects of daytime melatonin administration in humans." Sleep **20**(2): 124-31.
- Hunt, J. V., J. A. Simpson y cols. (1988). "Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins." Biochem J **250**(1): 87-93.
- Illnerova, H., J. Vanecek y cols. (1979). "Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin." J Neurochem **32**(2): 673-5.
- Imlay, J. A., S. M. Chin y cols. (1988). "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro." Science **240**(4852): 640-2.
- Isobe, Y., T. Torri y cols. (2002). "Effects of melatonin injection on running-wheel activity and body temperature differ by the time of day." Pharmacol Biochem Behav **73**(4): 805-11.
- Jackson, M. J. (2005). "Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1464): 2285-91.
- Jackson, M. J., R. H. Edwards y cols. (1985). "Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle." Biochim Biophys Acta **847**(2): 185-90.
- Jackson, M. J., D. A. Jones y cols. (1983). "Vitamin E and skeletal muscle." Ciba Found Symp **101**: 224-39.
- Jain, A., J. Martensson y cols. (1992). "Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects on lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 5093-7.
- Janero, D. R. (1990). "Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury." Free Radic Biol Med **9**(6): 515-40.
- Janssen, Y. M., B. Van Houten y cols. (1993). "Cell and tissue responses to oxidative damage." Lab Invest **69**(3): 261-74.
- Javesghani, D., S. A. Magder y cols. (2002). "Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles." Am J Respir Crit Care Med **165**(3): 412-8.
- Jenkins, R. R., R. Friedland y cols. (1984). "The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle." Int J Sports Med **5**(1): 11-4.
- Ji, L. L. (1993). "Antioxidant enzyme response to exercise and aging." Med Sci Sports Exerc **25**(2): 225-31.
- Ji, L. L. (2001). "Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress?" Ann N Y Acad Sci **928**: 236-47.
- Ji, L. L. y R. Fu (1992). "Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide." J Appl Physiol **72**(2): 549-54.
- Ji, L. L., R. Fu y cols. (1992). "Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity." J Appl Physiol **73**(5): 1854-9.
- Ji, L. L., M. C. Gomez-Cabrera y cols. (2007). "Role of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation." J Appl Physiol Nutr Metab **32**(5): 930-5.
- Ji, L. L., F. W. Stratman y cols. (1988). "Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise." Arch Biochem Biophys **263**(1): 150-60.
- Johe, P. D. y B. Osterud (2005). "The in vivo effect of melatonin on cellular activation processes in human blood during strenuous physical exercise." J Pineal Res **39**(3): 324-30.
- John, T. M., F. W. Beamish y cols. (1983). "Diurnal impact of locomotory activity and melatonin and N-acetylserotonin treatment on blood metabolite levels in the rainbow trout." Arch Int Physiol Biochim **91**(2): 115-20.

- Kaczor, J. J., J. E. Hall y cols. (2007). "Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice." Free Radic Biol Med **43**(1): 145-54.
- Kamada, T., S. Tokuda y cols. (1993). "Higher levels of erythrocyte membrane fluidity in sprinters and long-distance runners." J Appl Physiol **74**(1): 354-8.
- Kanner, J., J. B. German y cols. (1987). "Initiation of lipid peroxidation in biological systems." Crit Rev Food Sci Nutr **25**(4): 317-64.
- Kanter, M. M., R. L. Hamlin y cols. (1985). "Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin." J Appl Physiol **59**(4): 1298-303.
- Kanter, P. M., G. A. Bullard y cols. (1993). "Comparison of the cardiotoxic effects of liposomal doxorubicin (TLC D-99) versus free doxorubicin in beagle dogs." In Vivo **7**(1): 17-26.
- Karbownik, M., R. J. Reiter y cols. (2000). "Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid." Biochim Biophys Acta **1523**(2-3): 140-6.
- Kaya, O., K. Gokdemir y cols. (2006). "Melatonin supplementation to rats subjected to acute swimming exercise: Its effect on plasma lactate levels and relation with zinc." Neuro Endocrinol Lett **27**(1-2): 263-6.
- Khassaf, M., R. B. Child y cols. (2001). "Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise." J Appl Physiol **90**(3): 1031-5.
- Khawli, F. A. y M. B. Reid (1994). "N-acetylcysteine depresses contractile function and inhibits fatigue of diaphragm in vitro." J Appl Physiol **77**(1): 317-24.
- Kim, J. D., B. P. Yu y cols. (1996). "Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses." Free Radic Biol Med **20**(1): 83-8.
- Kinnula, V. L. y J. D. Crapo (2003). "Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases." Am J Respir Crit Care Med **167**(12): 1600-19.
- Kinnula, V. L., J. D. Crapo y cols. (1995). "Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung." Lab Invest **73**(1): 3-19.
- Kobzik, L., M. B. Reid y cols. (1994). "Nitric oxide in skeletal muscle." Nature **372**(6506): 546-8.
- Kobzik, L., B. Stringer y cols. (1995). "Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships." Biochem Biophys Res Commun **211**(2): 375-81.
- Koop, D. R. (1992). "Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1." FASEB J **6**(2): 724-30.
- Kotler, M., C. Rodriguez y cols. (1998). "Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex." J Pineal Res **24**(2): 83-9.
- Kramer, H. F. y L. J. Goodyear (2007). "Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle." J Appl Physiol **103**(1): 388-95.
- Kuhry, J. G., P. Fonteneau y cols. (1983). "TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells." Cell Biophys **5**(2): 129-40.
- Kumar, C. T., V. K. Reddy y cols. (1992). "Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress." Mol Cell Biochem **111**(1-2): 109-15.
- Kumar, K. V. y M. Naidu (2002). "Effect of oral melatonin on exercise-induced oxidant stress in healthy subjects." Indian J Pharmacol **34**: 256-259.
- Lamas, S., P. A. Marsden y cols. (1992). "Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6348-52.
- Lambertucci, R. H., A. C. Levada-Pires y cols. (2007). "Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats." Mech Ageing Dev **128**(3): 267-75.

- Lamprecht, M., J. F. Greilberger y cols. (2008). "Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner." J Appl Physiol **104**(6): 1611-7.
- Leaf, D. A., M. T. Kleinman y cols. (1997). "The effect of exercise intensity on lipid peroxidation." Med Sci Sports Exerc **29**(8): 1036-9.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson y cols. (2001). Principios de bioquímica. Barcelona, Omega.
- León, J., D. Acuña-Castroviejo y cols. (2004). "Melatonin and mitochondrial function." Life Sci **75**(7): 765-90.
- Lerner, A. B., J. D. Case y cols. (1960). "Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands." J Biol Chem **235**: 1992-7.
- Levi, M., B. M. Baird y cols. (1990). "Cholesterol modulates rat renal brush border membrane phosphate transport." J Clin Invest **85**(1): 231-7.
- Levine, R. L., D. Garland y cols. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **186**: 464-78.
- Levine, R. L. y E. R. Stadtman (2001). "Oxidative modification of proteins during aging." Exp Gerontol **36**(9): 1495-502.
- Li, J. X., C. W. Tong y cols. (1999). "Changes in membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **80**(2): 113-7.
- Lieberman, H. R., F. Waldhauser y cols. (1984). "Effects of melatonin on human mood and performance." Brain Res **323**(2): 201-7.
- Lippi, G. y N. Maffulli (2009). "Biological influence of physical exercise on hemostasis." Semin Thromb Hemost **35**(3): 269-76.
- Lipton, S. A., Y. B. Choi y cols. (1993). "A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds." Nature **364**(6438): 626-32.
- López Chicharro, J. y S. Aznar Laín (2004). Transición aeróbica-anaeróbica : concepto, metodología de determinación y aplicaciones. Madrid, Master Line and Prodigio.
- Lowenstein, C. J. y S. H. Snyder (1992). "Nitric oxide, a novel biologic messenger." Cell **70**(5): 705-7.
- Lucia, A., B. Diaz y cols. (2001). "Hormone levels of world class cyclists during the Tour of Spain stage race." Br J Sports Med **35**(6): 424-30.
- MacDougall, J. D., D. Tuxen y cols. (1985). "Arterial blood pressure response to heavy resistance exercise." J Appl Physiol **58**(3): 785-90.
- Macías, M., G. Escames y cols. (2003). "Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship." Eur J Biochem **270**(5): 832-40.
- Macías, M., M. N. Rodríguez-Cabezas y cols. (1999). "Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*." J Pineal Res **27**(2): 86-94.
- MacMicking, J., Q. W. Xie y cols. (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol **15**: 323-50.
- Malech, H. L. y J. I. Gallin (1987). "Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases." N Engl J Med **317**(11): 687-94.
- Marcocci, L., L. Flohe y cols. (1997). "Evidence for a functional relevance of the selenocysteine residue in mammalian thioredoxin reductase." Biofactors **6**(3): 351-8.
- Marshall, K. A., R. J. Reiter y cols. (1996). "Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro." Free Radic Biol Med **21**(3): 307-15.
- Martensson, J., A. Jain y cols. (1991). "Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9360-4.
- Martensson, J. y A. Meister (1991). "Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4656-60.

- Martensson, J., R. Steinherz y cols. (1989). "Glutathione ester prevents buthionine sulfoximine-induced cataracts and lens epithelial cell damage." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8727-31.
- Martín, M., M. Macías y cols. (2000). "Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress." FASEB J **14**(12): 1677-9.
- Martín, M., M. Macías y cols. (2002). "Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria." Int J Biochem Cell Biol **34**(4): 348-57.
- Matuszczak, Y., M. Farid y cols. (2005). "Effects of N-acetylcysteine on glutathione oxidation and fatigue during handgrip exercise." Muscle Nerve **32**(5): 633-8.
- Maughan, R. J., M. Gleeson y cols. (1997). Biochemistry of exercise and training. Oxford ; New York, Oxford University Press.
- May, J. M., Z. C. Qu y cols. (1998). "Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid." Arch Biochem Biophys **349**(2): 281-9.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz y cols. (2002). "Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression." Cell Mol Life Sci **59**(10): 1706-13.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz y cols. (2005). "Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages." J Neuroimmunol **165**(1-2): 139-49.
- Mazepa, R. C., M. J. Cuevas y cols. (2000). "Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats." Life Sci **66**(2): 153-60.
- McArdle, A., D. Pattwell y cols. (2001). "Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses." Am J Physiol Cell Physiol **280**(3): C621-7.
- McArdle, F., S. Spiers y cols. (2004). "Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice." J Physiol **561**(Pt 1): 233-44.
- McCord, J. M. (2002). "Superoxide dismutase in aging and disease: an overview." Methods Enzymol **349**: 331-41.
- McCord, J. M. y I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-55.
- Meister, A. (1992). "Biosynthesis and functions of glutathione, an essential biofactor." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No: 1-6.
- Meister, A. (1994). "Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals." J Biol Chem **269**(13): 9397-400.
- Meister, A. y M. E. Anderson (1983). "Glutathione." Annu Rev Biochem **52**: 711-60.
- Melchiorri, D., R. J. Reiter y cols. (1995). "Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions." FASEB J **9**(12): 1205-10.
- Mendiratta, S., Z. Qu y cols. (1998). "Erythrocyte defenses against hydrogen peroxide: the role of ascorbic acid." Biochim Biophys Acta **1380**(3): 389-95.
- Mendoza, R., M. R. Sagrera Pérez y cols. (1994). Conductas de los escolares españoles relacionadas con la salud (1986-1990). Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Mero, A. A., M. Vahallummukka y cols. (2006). "Effects of resistance exercise session after oral ingestion of melatonin on physiological and performance responses of adult men." Eur J Appl Physiol **96**(6): 729-39.
- Miles, A. M., D. S. Bohle y cols. (1996). "Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide." J Biol Chem **271**(1): 40-7.
- Miller, N. J. y G. Paganga (1998). "Antioxidant activity of low-density lipoprotein." Methods Mol Biol **108**: 325-35.
- Mills, G. C. (1957). "Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte

- enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown." *J Biol Chem* **229**(1): 189-97.
- Miquel, J., A. C. Economos y cols. (1980). "Mitochondrial role in cell aging." *Exp Gerontol* **15**(6): 575-91.
- Miyazaki, H., S. Oh-ishi y cols. (2001). "Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise." *Eur J Appl Physiol* **84**(1-2): 1-6.
- Moldovan, L. y N. I. Moldovan (2004). "Oxygen free radicals and redox biology of organelles." *Histochem Cell Biol* **122**(4): 395-412.
- Monboisse, J. C. y J. P. Borel (1992). "Oxidative damage to collagen." *EXS* **62**: 323-7.
- Moncada, S. y E. A. Higgs (1991). "Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance." *Eur J Clin Invest* **21**(4): 361-74.
- Moncada, S. y E. A. Higgs (1995). "Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide." *FASEB J* **9**(13): 1319-30.
- Monteleone, P., A. Fuschino y cols. (1992). "Temporal relationship between melatonin and cortisol responses to nighttime physical stress in humans." *Psychoneuroendocrinology* **17**(1): 81-6.
- Monteleone, P., M. Maj y cols. (1990). "Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans." *Life Sci* **47**(22): 1989-95.
- Moopanar, T. R. y D. G. Allen (2005). "Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 degrees C." *J Physiol* **564**(Pt 1): 189-99.
- Morozov, V. I., S. A. Pryatkin y cols. (2003). "Effect of exercise to exhaustion on myeloperoxidase and lysozyme release from blood neutrophils." *Eur J Appl Physiol* **89**(3-4): 257-62.
- Moslen, M. T. (1994). "Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis." *Adv Exp Med Biol* **366**: 17-27.
- Motta, S., C. Letellier y cols. (2009). "Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs as assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraoxonase-1 activity." *Vet J* **181**(3): 288-95.
- Mustacich, D. y G. Powis (2000). "Thioredoxin reductase." *Biochem J* **346 Pt 1**: 1-8.
- Nakazawa, H., C. Genka y cols. (1996). "Pathological aspects of active oxygens/free radicals." *Jpn J Physiol* **46**(1): 15-32.
- Nathan, C. (2003). "Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling." *J Clin Invest* **111**(6): 769-78.
- Nave, R., P. Herer y cols. (1996). "Hypnotic and hypothermic effects of melatonin on daytime sleep in humans: lack of antagonism by flumazenil." *Neurosci Lett* **214**(2-3): 123-6.
- Nethery, D., L. A. Callahan y cols. (2000). "PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Appl Physiol* **89**(1): 72-80.
- Nielsen, F., B. B. Mikkelsen y cols. (1997). "Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors." *Clin Chem* **43**(7): 1209-14.
- Nieto, F. J., C. Iribarren y cols. (2000). "Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis?" *Atherosclerosis* **148**(1): 131-9.
- Niki, E. (1991). "Vitamin C as an antioxidant." *World Rev Nutr Diet* **64**: 1-30.
- Nohl, H. y D. Hegner (1978). "Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?" *Eur J Biochem* **82**(2): 563-7.
- Nordberg, J. y E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." *Free Radic Biol Med* **31**(11): 1287-312.
- O'Neill, C. A., C. L. Stebbins y cols. (1996). "Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats." *J Appl Physiol* **81**(3): 1197-206.
- Ochoa, J. J., J. Díaz-Castro y cols. (2011). "Melatonin supplementation ameliorates oxidative stress and inflammatory signaling

- induced by strenuous exercise in adult human males." J Pineal Res.
- Ohki, K., T. Takamura y cols. (1984). "Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation and acyl chain mobility of liver microsomes from vitamin E-deficient rat." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **30**(3): 221-34.
- Orlander, J., K. H. Kiessling y cols. (1977). "Low intensity training, inactivity and resumed training in sedentary men." Acta Physiol Scand **101**(3): 351-62.
- Ortega, F. B., J. R. Ruiz y cols. (2006). "Extreme mountain bike challenges may induce sub-clinical myocardial damage." J Sports Med Phys Fitness **46**(3): 489-93.
- Oztasan, N., S. Taysi y cols. (2004). "Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat." Eur J Appl Physiol **91**(5-6): 622-7.
- Pablos, M. I., M. T. Agapito y cols. (1995). "Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks." J Pineal Res **19**(3): 111-5.
- Pablos, M. I., R. J. Reiter y cols. (1998). "Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light." Neurochem Int **32**(1): 69-75.
- Pang, S. F., H. S. Yu y cols. (1980). "Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm." J Endocrinol **87**(1): 89-93.
- Pate, R. R. y C. Macera (1994). Risk of exercising: musculoskeletal damages. Physical activity, fitness, and health : international proceedings and consensus statement. C. Bouchard, R. J. Shephard y T. Stephens. Champaign, Illinois, Human Kinetics: XXIV, 1055 p.
- Peden, D. B., R. Hohman y cols. (1990). "Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7638-42.
- Petibois, C. y G. Deleris (2005). "Evidence that erythrocytes are highly susceptible to exercise oxidative stress: FT-IR spectrometric studies at the molecular level." Cell Biol Int **29**(8): 709-16.
- Philpot, R. M. (1991). "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." Methods Enzymol **206**: 623-31.
- Pierrefiche, G. y H. Laborit (1995). "Oxygen free radicals, melatonin, and aging." Exp Gerontol **30**(3-4): 213-27.
- Pierrefiche, G., G. Topall y cols. (1993). "Antioxidant activity of melatonin in mice." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **80**(2): 211-23.
- Pietraforte, D. y M. Minetti (1997). "Direct ESR detection of peroxynitrite-induced tyrosine-centred protein radicals in human blood plasma." Biochem J **325 (Pt 3)**: 675-84.
- Pinho, R. A., M. E. Andrades y cols. (2006). "Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise." Cell Biol Int **30**(10): 848-53.
- Poeggeler, B. y R. Hardeland (1994). "Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material." J Pineal Res **17**(1): 1-10.
- Pollock, M. L. (1973). "The quantification of endurance training programs." Exerc Sport Sci Rev **1**: 155-88.
- Postlethwait, E. M., S. D. Langford y cols. (1995). "NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." Free Radic Biol Med **19**(5): 553-63.
- Powers, S. K. y D. Criswell (1996). "Adaptive strategies of respiratory muscles in response to endurance exercise." Med Sci Sports Exerc **28**(9): 1115-22.
- Powers, S. K., D. Criswell y cols. (1994). "Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle." Am J Physiol **266**(2 Pt 2): R375-80.
- Powers, S. K., D. Criswell y cols. (1994). "Regional training-induced alterations in diaphragmatic oxidative and antioxidant enzymes." Respir Physiol **95**(2): 227-37.

- Powers, S. K., D. Criswell y cols. (1993). "Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium." Am J Physiol **265**(6 Pt 2): H2094-8.
- Powers, S. K., K. C. DeRuisseau y cols. (2004). "Dietary antioxidants and exercise." J Sports Sci **22**(1): 81-94.
- Powers, S. K. y M. J. Jackson (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." Physiol Rev **88**(4): 1243-76.
- Powers, S. K., L. L. Ji y cols. (1999). "Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review." Med Sci Sports Exerc **31**(7): 987-97.
- Pozo, D., R. J. Reiter y cols. (1994). "Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum." Life Sci **55**(24): PL455-60.
- Pozo, D., R. J. Reiter y cols. (1997). "Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin." J Cell Biochem **65**(3): 430-42.
- Prendergast, F. G., R. P. Haugland y cols. (1981). "1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers." Biochemistry **20**(26): 7333-8.
- Quintanilha, A. T., L. Packer y cols. (1982). "Membrane effects of vitamin E deficiency: bioenergetic and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria." Ann N Y Acad Sci **393**: 32-47.
- Racinais, S. y J. Oksa (2010). "Temperature and neuromuscular function." Scand J Med Sci Sports **20 Suppl 3**: 1-18.
- Radak, Z., M. Atalay y cols. (2008). "Exercise improves import of 8-oxoguanine DNA glycosylase into the mitochondrial matrix of skeletal muscle and enhances the relative activity." Free Radic Biol Med.
- Radak, Z., H. Y. Chung y cols. (2004). "Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise." FASEB J **18**(6): 749-50.
- Radak, Z., H. Naito y cols. (2002). "Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle." Pflugers Arch **445**(2): 273-8.
- Radi, R., J. S. Beckman y cols. (1991). "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." Arch Biochem Biophys **288**(2): 481-7.
- Radi, R., S. Tan y cols. (1992). "Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production." Biochim Biophys Acta **1122**(2): 178-82.
- Ray, G. y S. A. Husain (2002). "Oxidants, antioxidants and carcinogenesis." Indian J Exp Biol **40**(11): 1213-32.
- Refsgaard, H. H., L. Tsai y cols. (2000). "Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 611-6.
- Regnault, C., E. R. Postaire y cols. (1993). "Influence of beta carotene, vitamin E, and vitamin C on endogenous antioxidant defenses in erythrocytes." Ann Pharmacother **27**(11): 1349-50.
- Reid, M. B. (2001). "Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction." Med Sci Sports Exerc **33**(3): 371-6.
- Reid, M. B., K. E. Haack y cols. (1992). "Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro." J Appl Physiol **73**(5): 1797-804.
- Reid, M. B., F. A. Khawli y cols. (1993). "Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle." J Appl Physiol **75**(3): 1081-7.
- Reid, M. B., T. Shoji y cols. (1992). "Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals." J Appl Physiol **73**(5): 1805-9.

- Reiter, R. J. (1991). "Melatonin synthesis: multiplicity of regulation." Adv Exp Med Biol **294**: 149-58.
- Reiter, R. J. (1991). "Melatonin: the chemical expression of darkness." Mol Cell Endocrinol **79**(1-3): C153-8.
- Reiter, R. J. (1991). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions." Endocr Rev **12**(2): 151-80.
- Reiter, R. J. (1993). "The melatonin rhythm: both a clock and a calendar." Experientia **49**(8): 654-64.
- Reiter, R. J., D. X. Tan y cols. (2003). "Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants." Adv Exp Med Biol **527**: 539-48.
- Reiter, R. J., D. X. Tan y cols. (2003). "Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans." Acta Biochim Pol **50**(4): 1129-1146.
- Reiter, R. J., D. X. Tan y cols. (1994). "Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases." Ann N Y Acad Sci **719**: 1-12.
- Rice-Evans, C. y R. Burdon (1993). "Free radical-lipid interactions and their pathological consequences." Prog Lipid Res **32**(1): 71-110.
- Richter, C., J. W. Park y cols. (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6465-7.
- Rousseau, E. J., A. J. Davison y cols. (1992). "Protection by beta-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis." Free Radic Biol Med **13**(4): 407-33.
- Saarela, S. y R. J. Reiter (1994). "Function of melatonin in thermoregulatory processes." Life Sci **54**(5): 295-311.
- Sahu, S. C. y M. C. Washington (1991). "Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei." Cancer Lett **58**(1-2): 75-9.
- Sahu, S. C. y M. C. Washington (1992). "Effect of ascorbic acid and curcumin on quercetin-induced nuclear DNA damage, lipid peroxidation and protein degradation." Cancer Lett **63**(3): 237-41.
- Saltin, B. y L. B. Rowell (1980). "Functional adaptations to physical activity and inactivity." Fed Proc **39**(5): 1506-13.
- Samuni, A., J. Aronovitch y cols. (1983). "On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism." Eur J Biochem **137**(1-2): 119-24.
- Sastre, J., M. Asensi y cols. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." Am J Physiol **263**(5 Pt 2): R992-5.
- Sastre, J., F. V. Pallardo y cols. (2000). "Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis." IUBMB Life **49**(5): 427-35.
- Satoh, K. y K. Mishima (2001). "Hypothermic action of exogenously administered melatonin is dose-dependent in humans." Clin Neuropharmacol **24**(6): 334-40.
- Saugstad, O. D. (1990). "Oxygen toxicity in the neonatal period." Acta Paediatr Scand **79**(10): 881-92.
- Schapira, A. H. y J. M. Cooper (1992). "Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing." Mutat Res **275**(3-6): 133-43.
- Schreck, R., K. Albermann y cols. (1992). "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)." Free Radic Res Commun **17**(4): 221-37.
- Schroeder, F. (1984). "Role of membrane lipid asymmetry in aging." Neurobiol Aging **5**(4): 323-33.
- Selman, C., J. S. McLaren y cols. (2002). "Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running." Arch Biochem Biophys **401**(2): 255-61.

- Sen, C. K. (2001). "Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction." Med Sci Sports Exerc **33**(3): 368-70.
- Sen, C. K., M. Atalay y cols. (1994). "Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency." J Appl Physiol **77**(5): 2177-87.
- Sen, C. K., E. Marin y cols. (1992). "Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization." J Appl Physiol **73**(4): 1265-72.
- Serrano, E., C. Venegas y cols. (2010). "Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition." J Sports Sci **28**(10): 1047-56.
- Shida, C. S., A. M. Castrucci y cols. (1994). "High melatonin solubility in aqueous medium." J Pineal Res **16**(4): 198-201.
- Shin, Y. A., J. H. Lee y cols. (2008). "Exercise training improves the antioxidant enzyme activity with no changes of telomere length." Mech Ageing Dev.
- Shinitzky, M. (1984). "Membrane fluidity in malignancy. Adversative and recuperative." Biochim Biophys Acta **738**(4): 251-61.
- Sies, H. y R. Mehlhorn (1986). "Mutagenicity of nitroxide-free radicals." Arch Biochem Biophys **251**(1): 393-6.
- Sik, R. H., C. S. Paschall y cols. (1983). "The phototoxic effect of benoxapofen and its analogs on human erythrocytes and rat peritoneal mast cells." Photochem Photobiol **38**(4): 411-5.
- Singer, S. J. y G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Siu, A. W., R. J. Reiter y cols. (1998). "The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates." J Pineal Res **24**(4): 239-44.
- Siu, A. W., R. J. Reiter y cols. (1999). "Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates." J Pineal Res **27**(2): 122-8.
- Slater, S. J., M. B. Kelly y cols. (1994). "The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure." J Biol Chem **269**(7): 4866-71.
- Sohal, R. S. y U. T. Brunk (1992). "Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence." Mutat Res **275**(3-6): 295-304.
- Sparrow, C. P. y J. Olszewski (1993). "Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions." J Lipid Res **34**(7): 1219-28.
- Squadrito, G. L. y W. A. Pryor (1998). "Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide." Free Radic Biol Med **25**(4-5): 392-403.
- St-Pierre, J., J. A. Buckingham y cols. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." J Biol Chem **277**(47): 44784-90.
- Stadtman, E. R. (1993). "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions." Annu Rev Biochem **62**: 797-821.
- Stadtman, E. R. (2001). "Protein oxidation in aging and age-related diseases." Ann N Y Acad Sci **928**: 22-38.
- Stadtman, E. R., P. E. Starke-Reed y cols. (1992). "Protein modification in aging." EXS **62**: 64-72.
- Strassman, R. J., C. R. Qualls y cols. (1991). "Elevated rectal temperature produced by all-night bright light is reversed by melatonin infusion in men." J Appl Physiol **71**(6): 2178-82.
- Stubbs, C. D. y A. D. Smith (1984). "The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function." Biochim Biophys Acta **779**(1): 89-137.
- Subramaniam, R., F. Roediger y cols. (1997). "The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of

- cortical synaptosomal membrane proteins." J Neurochem **69**(3): 1161-9.
- Sudhahar, C. G., R. M. Haney y cols. (2008). "Cellular membranes and lipid-binding domains as attractive targets for drug development." Curr Drug Targets **9**(8): 603-13.
- Sunshine, C. y M. G. McNamee (1994). "Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity." Biochim Biophys Acta **1191**(1): 59-64.
- Supinski, G. S. y L. A. Callahan (2007). "Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions." J Appl Physiol **102**(5): 2056-63.
- Sureda, A., M. D. Ferrer y cols. (2007). "Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players." Br J Sports Med.
- Szygula, Z. (1990). "Erythrocytic system under the influence of physical exercise and training." Sports Med **10**(3): 181-97.
- Tan, D. X., L. C. Manchester y cols. (2000). "Melatonin suppresses autoxidation and hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in monkey brain homogenate." Neuro Endocrinol Lett **21**(5): 361-365.
- Tan, D. X., L. C. Manchester y cols. (2000). "Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation." Free Radic Biol Med **29**(11): 1177-85.
- Tan, D. X., B. Poeggeler y cols. (1993). "The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo." Cancer Lett **70**(1-2): 65-71.
- Telfer, A., S. Dhami y cols. (1994). "beta-Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers." Biochemistry **33**(48): 14469-74.
- Terblanche, S. E. (2000). "The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats." Cell Biol Int **23**(11): 749-53.
- Theron, J. J., J. M. Oosthuizen y cols. (1984). "Effect of physical exercise on plasma melatonin levels in normal volunteers." S Afr Med J **66**(22): 838-41.
- Thornley, L. J., N. S. Maxwell y cols. (2003). "Local tissue temperature effects on peak torque and muscular endurance during isometric knee extension." Eur J Appl Physiol **90**(5-6): 588-94.
- Tian, Y., J. Nie y cols. (2010). "Serum oxidant and antioxidant status during early and late recovery periods following an all-out 21-km run in trained adolescent runners." Eur J Appl Physiol **110**(5): 971-6.
- Tidball, J. G., E. Lavergne y cols. (1998). "Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): C260-6.
- Tomita-Yamaguchi, M., C. Rubio y cols. (1991). "Regional influences on the physical properties of T cell membranes." Life Sci **48**(5): 433-8.
- Tresguerres, J. A. F. y C. Ariznavarreta (2006). Fisiología humana. Madrid [etc.], McGraw-Hill Interamericana.
- Tsuda, K., A. Yoshikawa y cols. (2003). "Effects of mild aerobic physical exercise on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension." Clin Exp Pharmacol Physiol **30**(5-6): 382-6.
- Vakkuri, O., J. Leppaluoto y cols. (1985). "Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine." Life Sci **37**(5): 489-95.
- Valko, M., H. Morris y cols. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem **12**(10): 1161-208.
- Vasankari, T. J., U. M. Kujala y cols. (1997). "Effects of acute prolonged exercise on-serum and LDL oxidation and antioxidant defences." Free Radic Biol Med **22**(3): 509-13.
- Veneroso, C., M. J. Tunon y cols. (2009). "Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise." J Pineal Res **47**(2): 184-91.

- Viani, P., G. Cervato y cols. (1991). "Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties." J Neurochem **56**(1): 253-8.
- Vider, J., D. E. Laaksonen y cols. (2001). "Physical exercise induces activation of NF-kappaB in human peripheral blood lymphocytes." Antioxid Redox Signal **3**(6): 1131-7.
- Vijayalaxmi, R. J. Reiter y cols. (1995). "Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage." Mutat Res **346**(1): 23-31.
- Vina, J., M. C. Gomez-Cabrera y cols. (2000). "Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants." IUBMB Life **50**(4-5): 271-7.
- Vlasic, N., M. S. Medow y cols. (1993). "Lipid fluidity modulates platelet aggregation and agglutination in vitro." Life Sci **53**(13): 1053-60.
- Voet, D. V., Judith G. (2007). Fundamental of Biochemistry, Ed. Médica Panamericana.
- Waldhauser, F., J. Kovacs y cols. (1998). "Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders." Exp Gerontol **33**(7-8): 759-72.
- Walters, T. J., K. L. Ryan y cols. (2000). "Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature." J Appl Physiol **89**(2): 799-806.
- Weinert, D. y J. Waterhouse (2007). "The circadian rhythm of core temperature: effects of physical activity and aging." Physiol Behav **90**(2-3): 246-56.
- Wheeler, C. R., J. A. Salzman y cols. (1990). "Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity." Anal Biochem **184**(2): 193-9.
- Wilmore, J. H. y D. L. Costill (2004). Physiology of sport and exercise. Champaign, IL ; Windsor, ON, Human Kinetics.
- Winterbourn, C. C., R. E. Hawkins y cols. (1975). "The estimation of red cell superoxide dismutase activity." J Lab Clin Med **85**(2): 337-41.
- Wisloff, U., J. Helgerud y cols. (2001). "Intensity-controlled treadmill running in rats: VO(2 max) and cardiac hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H1301-10.
- Xia, R., J. A. Webb y cols. (2003). "Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide." Am J Physiol Cell Physiol **285**(1): C215-21.
- Yaga, K., D. X. Tan y cols. (1993). "Unusual responses of nocturnal pineal melatonin synthesis and secretion to swimming: attempts to define mechanisms." J Pineal Res **14**(2): 98-103.
- Yamamoto, M. y H. Kanehisa (1995). "Dynamics of anaerobic and aerobic energy supplies during sustained high intensity exercise on cycle ergometer." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **71**(4): 320-5.
- Yang, R. C., G. W. Mack y cols. (1998). "Albumin synthesis after intense intermittent exercise in human subjects." J Appl Physiol **84**(2): 584-92.
- Yu, B. P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." Physiol Rev **74**(1): 139-62.
- Yu, B. P., E. A. Suescun y cols. (1992). "Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction." Mech Ageing Dev **65**(1): 17-33.
- Yui, Y., R. Hattori y cols. (1991). "Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils." J Biol Chem **266**(6): 3369-71.
- Zarkovic, K. (2003). "4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases." Mol Aspects Med **24**(4-5): 293-303.
- Zerba, E., T. E. Komorowski y cols. (1990). "Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice." Am J Physiol **258**(3 Pt 1): C429-35.
- Zhang, H., G. L. Squadrito y cols. (1999). "Reaction of peroxynitrite with melatonin: A

Esfuerzo físico agudo, estrés oxidativo y melatonina

- mechanistic study." Chem Res Toxicol **12**(6): 526-34.
- Zhang, P. y S. T. Omaye (2000). "Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol." Toxicology **146**(1): 37-47.
- Zigler, J. S., Jr. y J. D. Goosey (1981). "Photosensitized oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens." Photochem Photobiol **33**(6): 869-74.
- Zimmer, G., T. Thrich y cols. (1993). Membrane fluidity and vitamin E. Vitamin E in health and disease. L. Packer y J. Fuchs. New York, Dekker: 207-213.
- Zuo, L., F. L. Christofi y cols. (2004). "Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle." J Appl Physiol **97**(2): 661-8.