

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA-ESPAÑA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES
MÉDICO-QUIRÚRGICAS



**DAÑO OXIDATIVO PULMONAR INDUCIDO POR EJERCICIO
AERÓBICO PROLONGADO EVALUADO A TRAVÉS DEL
ANÁLISIS DEL AIRE ESPIRADO CONDENSADO**

OSCAR FLORENCIO ARANEDA VALENZUELA

2012

TÍTULO: *Daño oxidativo pulmonar inducido por ejercicio aeróbico*

prolongado evaluado a través del análisis del aire espirado condensado

AUTOR: *Oscar Florencio Araneda Valenzuela*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA-ESPAÑA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES
MÉDICO-QUIRÚRGICAS

**DAÑO OXIDATIVO PULMONAR INDUCIDO POR EJERCICIO
AERÓBICO PROLONGADO EVALUADO A TRAVÉS DEL
ANÁLISIS DEL AIRE ESPIRADO CONDENSADO**

TESIS PARA LA COLACIÓN DEL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS DEL
EJERCICIO IMPLICADAS EN EL
PROGRESO DEPORTIVO DEL SER
HUMANO
POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,
ESPAÑA, QUE PRESENTA EL
LICENCIADO

OSCAR FLORENCIO ARANEDA VALENZUELA

Dirigida por:

PROF. DR. JOSE NARANJO ORELLANA
PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ BERRAL DE LA ROSA

Tutor:
PROF. DR. PEDRO CARPINTERO BENITEZ

DEDICATORIA

A mis Padres Florencio y Graciela.

A mi hermano Fernando y su familia.

A Guacolda, Alejandro, Claudia, Guillermo y Claudia.

A María Irma y Ramón.

A Jorge José.

A Ventura del Carmen.

A David y Myriam.

A mis Maestros.

A mis queridos alumnos.

A mi Mujer María Paulina y nuestros amados hijos David y Laura.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Ariel Guevara por su gran ayuda en la toma de muestras.

Al Sr. Luis Pizarro por su desinteresada y constante ayuda desde el primer día en que comenzamos este trabajo.

A los Sres. Carlos García y Cristóbal Contreras por su ayuda en el análisis químico.

Al Prof. Dr. Néstor Lagos por permitir el uso de los equipos para el análisis químico.

Al Prof. Dr. Christian Bonansco por permitir las condiciones para el desarrollo de esta investigación.

Al Prof. Dr. Claus Behn por la posibilidad de iniciar esta pequeña línea de trabajo en su laboratorio, sus consejos y amistad.

Al Prof. Dr Francisco Jose Berral de la Rosa por permitirme ser partícipe de este programa de postgrado y por su invaluable ayuda.



JOSE NARANJO ORELLANA Y FRANCISCO JOSE BERRAL DE LA ROSA,
DOCTORES EN MEDICINA Y CIRUGÍA

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Daño oxidativo pulmonar inducido por ejercicio aeróbico prolongado evaluado a través del análisis de aire espirado condensado”** ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Deporte e Informática de la Universidad pablo de Olavide de Sevilla y en el Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Universidad de Córdoba (España), por el Doctorando **D. OSCAR FLORENCIO ARANEDA VALENZUELA**. Que a nuestro juicio, dicho trabajo de investigación, reúne meritos suficientes para optar al grado de Doctor en Ciencias del Ejercicio implicadas en el progreso deportivo del ser humano por la Universidad de Córdoba, España.

Sevilla, cuatro de octubre de dos mil once

A handwritten signature in black ink, appearing to be the signature of Jose Naranjo Orellana. It consists of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be the signature of Francisco Jose Berral de la Rosa. It features several horizontal strokes and a vertical stroke, with a long horizontal stroke extending to the right.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
CC-16: Proteínas derivadas de las células claras
CO: Monóxido de Carbono
CO₂: Dióxido de Carbono
DE: Desviación estándar
EBC: Aire espirado condensado
GPHx: Glutación peroxidasa
GSH: Glutación reducido
GSSG: Glutación oxidado
HClO₄: Ácido perclórico
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HOCl: Ácido hipocloroso
H₃PO₄: Ácido fosfórico
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
MAP: Proteína kinasa activada por mitógenos
MDA: Malondialdehído
NADPHox: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NF-κB: Factor Nuclear kappa B
MP₁₀: Material particulado respirable
NO•: Óxido nítrico
NO₂: Dióxido de nitrógeno
NO₂⁻: Nitrito
O₃: Ozono
O₂^{•-}: Anión superóxido
OH•: Radical hidroxilo
ONOO⁻: Peroxinitrito
SO₂: Dióxido de azufre
SOD: Superóxido dismutasa
TBA: Ácido tiobarbitúrico
TBARs: Derivados de la reacción con el ácido tiobarbitúrico
TBA: Ácido tiobarbitúrico
VEF₁: Volumen espiratorio forzado durante el primer segundo

1. ÍNDICE GENERAL

CAPITULO 1

Resumen	11
Abstract	11
Introducción	13
Radicales libres, antioxidantes y daño oxidativo	16
Evaluación del estado redox	21
Daño oxidativo inducido por ejercicio	22
Daño oxidativo como factor etiopatogénico en las enfermedades pulmonares	26
Estudio del aire espirado condensado	28

CAPITULO 2

Justificación del tema y objetivos	31
Hipótesis	32
Hipótesis alterna	32
Objetivo General	33
Objetivos específicos	33

CAPITULO 3

Material y Métodos	34
Muestra	35
Equipo de obtención de EBC	39
Protocolo de toma de muestras EBC	42
Determinación química de $[MDA]_{EBC}$	43
Determinación química de $[H_2O_2]_{EBC}$	46
Determinación química de $[NO_2^-]_{EBC}$	47
pH en EBC	48
Análisis estadístico	50
Índices de Calidad	51
Artículos publicados	51
Presentaciones a congresos	54

CAPITULO 4

Resultados	55
------------------	----

CAPITULO 5

Discusión	68
-----------------	----

CAPITULO 6

Conclusiones	75
Implicancias y Proyecciones	77

CAPITULO 7

Referencias bibliográficas	79
----------------------------------	----

CAPITULO 8

Anexos	90
Anexo 1	91
Anexo 2	92
Anexo 3	93
Anexo 4	98
Anexo 5	107
Anexo 6	118
Anexo 7	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	16
Figura 2.....	18
Figura 3.....	19
Figura 4.....	20
Figura 5.....	21
Figura 6.....	27
Figura 7.....	29
Figura 8.....	30
Figura 9.....	30
Figura 10.....	39
Figura 11.....	40
Figura 12.....	41
Figura 13.....	42

Figura 14.....	43
Figura 15.....	44
Figura 16.....	44
Figura 17.....	45
Figura 18.....	46
Figura 19.....	46
Figura 20.....	47
Figura 21.....	48
Figura 22.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	36
Tabla 2.....	37
Tabla 3.....	38
Tabla 4.....	65
Tabla 5.....	66
Tabla 6.....	66
Tabla 7.....	67
Tabla 8.....	67

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.....	56
Gráfico 2.....	57
Gráfico 3.....	58
Gráfico 4.....	58
Gráfico 5.....	59
Gráfico 6.....	60
Gráfico 7.....	60
Gráfico 8.....	61
Gráfico 9.....	61
Gráfico 10.....	62
Gráfico 11.....	62
Gráfico 12.....	63
Gráfico 13.....	64
Gráfico 14.....	64

RESUMEN

Se utilizó el análisis del aire espirado condensado (EBC) para evaluar el impacto de las carreras de resistencia sobre la formación de pro-oxidantes, lipidoperoxidación e inflamación pulmonar. Dieciocho, doce y diecisiete corredores aficionados sanos, de ambos sexos, participaron en pruebas de 10, 21 y 42 km respectivamente. Se obtuvieron muestras de EBC previo, a los 20 y 80 minutos posteriores a las carreras. Se determinó la concentración de H_2O_2 , NO_2^- , MDA y pH. Post-carrera los participantes de 21 y 42 km presentaron mayor concentración de H_2O_2 y NO_2^- sin observarse variaciones en el grupo de 10 km. No se evidenciaron cambios en la concentración de MDA dentro los grupos de 10 y 42 km respectivamente, tampoco se observó diferencias al comparar los grupos referidos. El pH no mostró diferencias dentro de los grupos. El promedio de ΔH_2O_2 y ΔNO_2^- en el grupo de 42 km fue mayor respecto del grupo 10 km. El promedio de los ΔpH disminuyó para 21 y 42 km. Para el grupo de 10 km se observó un aumento de este parámetro, mostrando un promedio significativamente mayor que para 21 y 42 km. Los ΔH_2O_2 y ΔNO_2^- correlacionaron en forma directa con el tiempo de carrera, mientras ΔpH , mostró una asociación inversa. Los valores de H_2O_2 y NO_2^- correlacionaron entre sí de forma directa, mientras el pH mostró correlaciones inversas con los valores de H_2O_2 y NO_2^- respectivamente. En conclusión, el ejercicio intenso prolongado favorece el aumento de los pro-oxidantes y favorece la inflamación pulmonar, sin modificaciones sobre la lipidoperoxidación. El tiempo de carrera se relaciona con la magnitud de la formación de pro-oxidantes y la inflamación aguda pulmonar post ejercicio.

Palabras claves: condensado de aire espirado, estrés oxidativo en el pulmón, ejercicio físico, corredores de larga distancia.

ABSTRACT

Exhaled breath condensate (EBC) was used to evaluate impact of endurance races on pro-oxidative formation, lipoperoxidation and pulmonary inflammation. Eighteen, twelve and seventeen healthy recreational runners, of both sexes, took part in 10, 21 and 42 km runs, respectively. EBC samples were collected before the run, at 20 and at 80 minutes after the run. Concentrations of H_2O_2 , NO_2^- , malondialdehyde (MDA) and pH were determined. After the run, participants of the 21 and 42 km circuits showed higher H_2O_2 and NO_2^- concentrations while no variations were observed in the 10 km group. There were no observed changes in MDA concentration within the 10 and 42 km groups, and there were no differences when comparing them. pH showed no differences within these groups. ΔH_2O_2 y ΔNO_2^- averages in the 42 km group were higher than in the 10 km group. ΔpH averages decreased for the 21 and 42 km groups. An increase in this parameter was observed in the 10 km group, showing a significantly higher average value than 21 and 42 km groups. ΔH_2O_2 y ΔNO_2^- correlated directly with race time, while ΔpH , showed an inverse correlation. H_2O_2 y NO_2^- values correlated directly between them, while pH showed inverse correlations with H_2O_2 y NO_2^- values respectively. In conclusion, intense prolonged exercise favors the increase in pro-oxidative levels and pulmonary inflammation, with no modifications on lipoperoxidation. Running time also relates to the magnitude of pro-oxidative formation and acute post exercise pulmonary inflammation.

Keywords: exhaled breath condensate, oxidative stress in the lung, physical exercise, long distance runners.

1. INTRODUCCIÓN

El ejercicio físico aumenta la generación de pro-oxidantes y favorece el daño oxidativo (OS) tanto sistémico como órgano específico (Sachdev y Davies, 2008; Powers et al., 2010). El daño oxidativo inducido por ejercicio fue reportado inicialmente hace más de 30 años (Dillard et al., 1978), sin embargo, sus efectos pulmonares han sido poco abordados, más aún, los estudios desarrollados utilizan casi exclusivamente modelos animales. En muestras de tejido pulmonar se ha reportado daño oxidativo a proteínas (Guidi et al., 2011; Radak et al., 1998), lípidos (Reddy et al., 1998) y al ADN (Asami et al., 1998) en animales que realizaron ejercicio en forma aguda.

Uno de los contextos más habituales de la aparición de OS es formando parte de un proceso inflamatorio (Holguin y Fitzpatrick, 2010), esta asociación cobra particular importancia ya que en varias enfermedades pulmonares, el OS ha sido involucrado como participante en su origen o progresión (Ward, 2010).

Previamente en deportistas de resistencia se ha encontrado un patrón inflamatorio de su vía aérea, determinado a través del estudio del lavado bronquio-alveolar y biopsia endobronquial en esquiadores (Sue-Chu et al., 1999; Karjalainen, 2000). A pesar del gran aporte del estudio directo de tejido pulmonar, la obtención de las muestras no está exenta de riesgos, además requiere materiales y personal entrenado. Esto promovió el surgimiento de métodos experimentales no invasivos para estudiar el sistema respiratorio; NO exhalado, lavado nasal y esputo inducido. Utilizando estas metodologías, en humanos se ha descrito el daño oxidativo e inflamación originada en la vía aérea en esquiadores de fondo (Sue-Chu et al., 2010), nadadores (Pedersen et al., 2008) y corredores de resistencia (Bonsignore et al., 2001; Chimenti et al., 2010). Sumado a los métodos referidos, utilizando muestras de condensado del aire espirado (EBC) en ejercicio se han medido marcadores de OS; Nowak et al., 2001, no encontraron diferencias en las concentraciones de H_2O_2 y de TBARs después de un ejercicio en cicloergómetro. Marek et al., 2008 encontraron similares resultados al estudiar la concentraciones de H_2O_2 . Font-Ribera et al., 2010 en nadadores de piscina, no encontraron diferencias en la concentración de 8-isoprostanos. Araneda et al., 2005 encontraron aumentos de la concentración de H_2O_2 y malondialdehído (MDA) en EBC, tanto en muestras obtenidas en la escalada a una altura de 6125 metros, como en ciclistas a una altura

de 2160 metros. Un reporte posterior mostró un aumento de la concentración de H_2O_2 y 8-isoprostanos en participantes de competencias de biatlón que entrenaban en la altura (Heinicke et al., 2009). En la siguiente tesis se evaluaron las modificaciones agudas por ejercicio sobre indicadores de la formación de pro-oxidantes, daño oxidativo e inflamación pulmonar medidas en muestras de EBC obtenidas de participantes de carreras de resistencia a baja altura.

RADICALES LIBRES, ANTIOXIDANTES Y DAÑO OXIDATIVO

El vivir en condiciones aeróbicas implica la formación de sustancias pro-oxidantes, que pueden ser definidas como un grupo de elementos químicos que dan lugar a la formación de radicales libres. Entre los pro-oxidantes de relevancia biológica son cruciales las especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno. Las reacciones formadores de pro-oxidantes más relevantes pueden ser analizadas en la figura 1.

A

Superóxido	$O_2^{\bullet-}$
Hidroxilo	OH^{\bullet}
Peroxilo	RO_2^{\bullet}
Alcoxilo	RO^{\bullet}
Hidroperoxilo	HO_2^{\bullet}

B

Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2
Ácido Hipocloroso	$HOCl$
Ozono	O_3
Peroxinitrito	$ONOO^-$

Figura 1. Sustancias pro-oxidantes que corresponden a especies reactivas derivadas de oxígeno y del nitrógeno formadas habitualmente en los organismos aeróbicos. (A) Sustancias pro-oxidantes del tipo radicales libres (B) Sustancias pro-oxidantes no radicales. Adaptado de Halliwell, Barry y Gutteridge, John M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine* Tercera edición. Oxford University press 1999, capítulo 1.

Los radicales libres son átomos o moléculas que, en términos generales poseen alta reactividad, ya que en su estructura contienen uno o más electrones desapareados, de esta forma pueden interactuar químicamente aceptando o cediendo electrones con las diferentes variedades de biomoléculas que nos constituyen; lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos. Este proceso, genera cambios estructurales de las biomoléculas, con la consecuente alteración de las condiciones de funcionamiento normal de nuestras células, relacionándose además con distintos estados de enfermedad (Halliwell y Gutteridge, 1999; Valko et al., 2006).

Del mismo modo y dado que en estado fisiológico se forman radicales libres en nuestro organismo (figura 2), como contraparte, existe un sistema constituido por moléculas que desarrollan funciones antioxidantes. Los antioxidantes pueden ser definidos como aquellas sustancias, que en pequeñas concentraciones, son capaces de interactuar directamente o impedir la generación de radicales libres, y con esto, aminorar el daño oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1999).

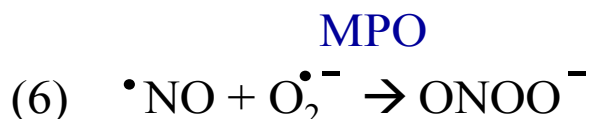
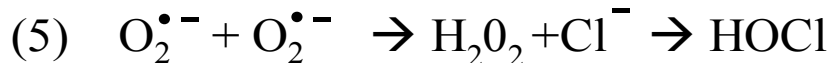
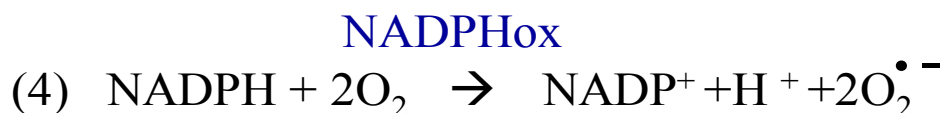
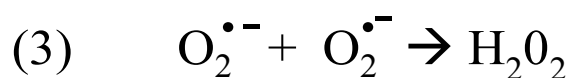
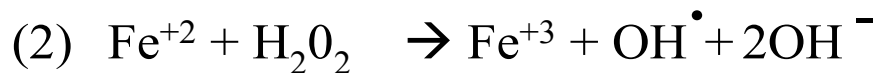
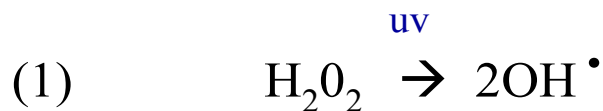


Figura 2. Reacciones de generación de pro-oxidantes relevantes en cuanto a la frecuencia de su generación, así como su participación en los diversos procesos biológicos que involucran la generación de daño oxidativo. (1) y (2) Formación de hidroxilo a partir de H_2O_2 por la acción de la radiación ultravioleta y por la presencia de Fe^{+2} (reacción de Fenton) respectivamente. (3) Formación de H_2O_2 por la dismutación de radicales superóxido. (4) Formación de radical superóxido por la acción de la enzima NADPH oxidasa. (5) Formación de ácido hipocloroso por la acción de la mieloperoxidasa (MPO). (6) Formación de peroxinitrito a partir de la reacción entre óxido nítrico y radicales superóxido.

Las moléculas con función antioxidante presentes en nuestro organismo pueden ser agrupadas en dos grandes categorías; las no enzimáticas, también conocidas como quebradoras de cadena o sacrificiales (figura 4). Dentro de este grupo se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C), el alfa tocoferol (vitamina E), el ácido

úrico, proteínas, glutatión, melatonina, quelantes de metales y sustancias de origen vegetal obtenidos a partir de la dieta como flavonoides y carotenoides (Halliwell et al., 2005). Su mecanismo de funcionamiento es que pueden interactuar de forma no específica con los más variados tipos de radicales libres, transformándose ellos en radicales libres de menor reactividad, y en consecuencia, participando en la mantención del estado redox en condiciones normales o aminorando el desequilibrio oxidativo.

La segunda categoría de sustancias antioxidantes corresponde a las del tipo enzimático donde destaca el rol que desarrollan enzimas de alta distribución en los diferentes tejidos de nuestro organismo como la catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPHx). Las reacciones específicas en que las enzimas están involucradas se detallan en la figura 3.

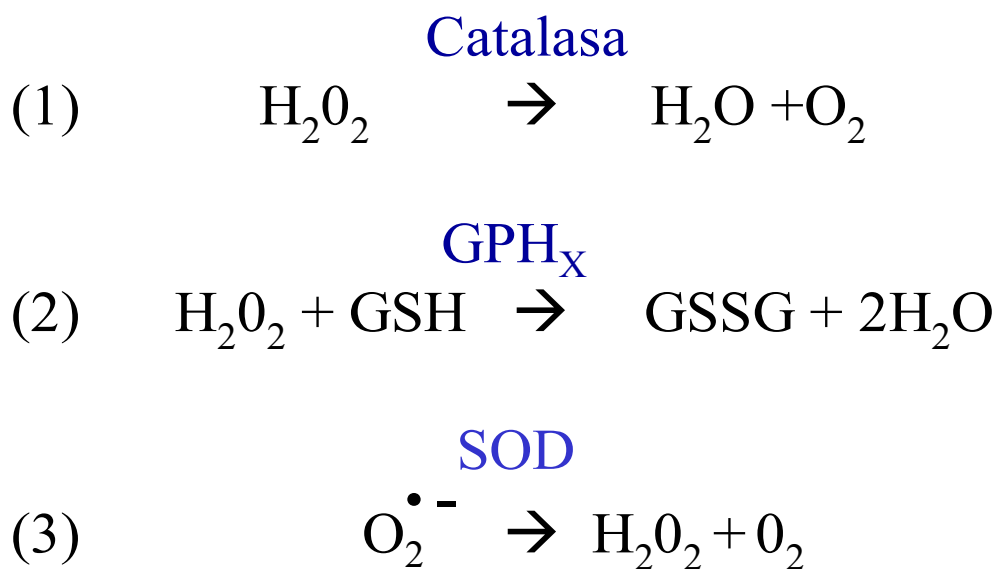
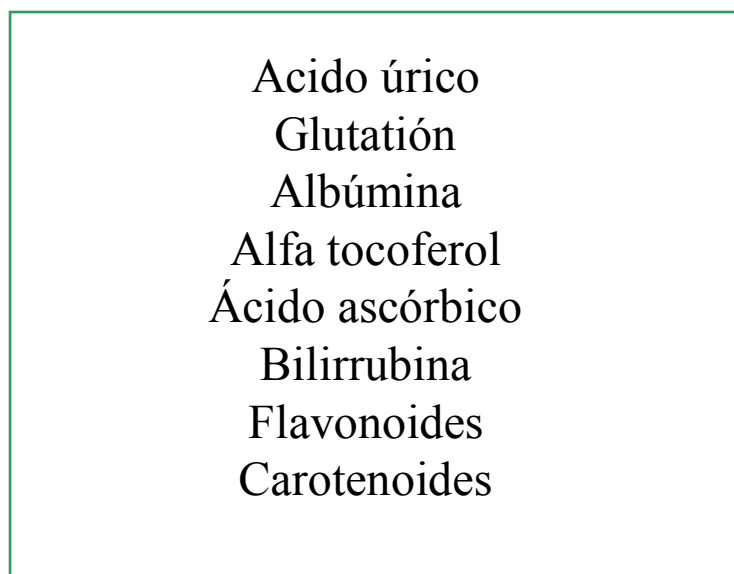


Figura 3. Reacciones que involucran la acción de antioxidantes del tipo enzimático en nuestro organismo. (1) Acción de la catalasa, catalizando la formación de agua y oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno. (2) Acción de la glutatión peroxidasa degradando el peróxido de hidrógeno en presencia de glutatión. (3) Acción de la superóxido dismutasa acelerando la dismutación de superóxido en peróxido de hidrógeno. Abreviaturas. SOD: superóxido dismutasa, GPHx: glutatión peroxidasa, GSH: glutatión reducido, GGSG: glutatión oxidado.

La relación entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes en cuanto a su concentración (no enzimáticas) o actividad (enzimáticas) forman

parte de un estado de equilibrio que permite el mantenimiento y funcionamiento normal de los diversos tejidos de nuestra economía, constituyendo en si mismo, una propiedad de los sistemas tisulares conocido como el estado redox del organismo u órgano. Cuando el estado de equilibrio fisiológico entre oxidantes y antioxidantes se altera, se dan las condiciones que originan la alteración del estado redox conocido como estrés oxidativo (Valko et al., 2006). La aparición del estrés oxidativo ha sido implicado en múltiples patologías como el cáncer, ateromatosis, fenómenos isquémicos, autoinmunes e infecciosos (Valko et al., 2006).



Acido úrico
Glutati3n
Albúmina
Alfa tocoferol
Ácido asc3rbico
Bilirrubina
Flavonoides
Carotenoides

Figura 4. Antioxidantes no enzimáticos presentes en los l3quidos corporales de humanos.

EVALUACIÓN DEL ESTADO REDOX

Con objeto de determinar la situación del estado redox en un modelo experimental, se debe recurrir a evaluar las condiciones de cada uno de sus constituyentes. De esta forma se hace necesario determinar la formación de pro-oxidantes. En condiciones ideales es aconsejable medir los radicales libres directamente, sin embargo, debido a que estas sustancias químicas son de breve vida media, sumado a la sofisticación y costos de las determinaciones, hace que muchas veces esto sea poco probable de realizar. Por esta razón, se acude a evaluar las concentraciones de pro-oxidantes de estructura más estables, que además se originan a partir de radicales libres (Ej: dismutación del superóxido en peróxido de hidrógeno, ver figura 2 ecuación 3). Otro acercamiento necesario para conocer el estado redox, es a través de la medición de la cantidad (antioxidantes no enzimáticos) o actividad (antioxidantes enzimáticos) de los antioxidantes. En último término, completando el cuadro del estado redox, es adecuado conocer el efecto de la acción de los pro-oxidantes sobre sus dianas biológicas, habiéndose desarrollado para esto técnicas analíticas que permiten conocer la repercusión del desequilibrio oxidativo sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (figura 5).

Proteínas	Carbonilos Nitración de proteínas
Lípidos	Malondialdehído 4-hidroxi-2-nonenal Isoprostanos Dienos conjugados
Ácidos nucleicos	8-Hidroxideoxiguanosina 8-Hidroxiguanosina

Figura 5. Marcadores de daño oxidativo utilizados con mayor frecuencia.

DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR EJERCICIO

El ejercicio físico es una condición que promueve el desequilibrio oxidativo. Este fenómeno ha sido un campo de activa investigación desde finales de los años 70. En esa época, uno de los primeros estudios mostró incrementos en el pentano exhalado como indicador de lipídoperoxidación en humanos que realizaban ejercicio (Dillard et al., 1978). De ahí en adelante, este campo ha sido ampliamente abordado, contando con más de dos mil trabajos referenciados en la base de datos PUBMED. La actual evidencia, conforma un gran cuerpo de información constituido por sendos estudios en animales y humanos que han sido revisados por varios autores hasta la fecha (Ji, 1995; Ji et al., 2004; Powers y Jackson, 2008; Ji, 2008 ; Sachdev y Davies, 2008).

Una primera área de interés en el estudio de este fenómeno corresponde a la caracterización del ejercicio como una condición donde aumenta la producción de sustancias pro-oxidantes, reportándose incrementos de la producción del anión superóxido (Reid et al., 1992), peróxido de hidrógeno (Reid et al., 1992), hidroxilo (O'Neill et al., 1996) y óxido nítrico (Balon et al., 1994). Los resultados anteriores han sido llevados a cabo estudiando el tejido muscular principalmente en condiciones controladas in vitro con una contracción muscular inducida, pero no describe las fuentes de pro-oxidantes en ejercicio que se pueden dar in vivo en otros procesos celulares y tejidos. En la misma dirección, múltiples son los estudios que han evaluado el efecto de la suplementación con sustancias antioxidantes con resultados no siempre consistentes (Abbey y Rankin, 2011; Allgrove et al., 2011; Gül et al., 2011; McAnulty et al., 2011; Theodorou et al., 2011). A continuación se resumen los principales antecedentes respecto al mecanismo de incremento de pro-oxidantes/daño oxidativo que han sido propuestos durante el ejercicio:

a) **Activación Mitocondrial:** las mitocondrias son un gran sitio de producción de radicales libres, sobre todo a partir de los complejos proteínicos I y III de su membrana, específicamente allí se forma anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Brand, 2010). En ejercicio se ha determinado un incremento de la formación de pro-oxidantes mitocondriales en un modelo de ejercicio en ratas (Boveris y Navarro, 2008).

b) **Xantina-oxidasa/reductasa:** En un modelo animal se demostró la activación de la xantina-oxidasa por ejercicio (Gómez-Cabrera et al., 2005). En humanos también se incrementan los pro-oxidantes a nivel plasmático en ciclistas (Gómez-Cabrera et al., 2003), hecho que fue atribuido a la acción de la xantina oxidasa, ya que el fenómeno fue suprimido por la administración de allopurinol (Gómez-Cabrera et al., 2008). Recientemente se demostró el incremento del anión superóxido extracelular en un modelo de contracción muscular de ratón. El origen de este incremento también fue atribuido a la activación de la xantina-oxidasa (Gómez-Cabrera et al., 2010).

c) **Fagocitos sanguíneos y tisulares:** el ejercicio incrementa el número de leucocitos con capacidad fagocítica. Estas células son activas generadoras de pro-oxidantes derivados del oxígeno y del nitrógeno (Babior et al., 1976). Un reporte inicial en un protocolo de intensidad submaximal mostró una disminución de la producción de H_2O_2 derivado de leucocitos polimorfonucleares (Macha et al., 1990). En ciclistas la capacidad de formar pro-oxidantes (estallido respiratorio) se mantuvo, mientras se observó un mayor número de neutrófilos hasta ocho horas posteriores a la prueba, lo que a la larga implica un potencial daño oxidativo (Kakanis et al., 2010).

d) **Oxido nítrico sintasa:** en un modelo de contracción de fibras musculares in vitro se ha descrito el incremento de la actividad de la oxido nítrico sintasa del tipo neuronal con aumento de la formación de óxido nítrico y de peroxinitrito enviado al espacio extracelular (Pattwell et al., 2004). Otra fuente conocida, fuente de incremento de pro-oxidantes, se debe a la inducción de la actividad del óxido nítrico sintasa mitocondrial por la realización de ejercicio crónico (Boveris y Navarro, 2008).

e) **Isquemia y reperfusión:** corresponde a un proceso ampliamente identificado como generador de pro-oxidantes y del posterior desequilibrio oxidativo tisular (Penna et al., 2009). La generación de los daños post reperfusión están relacionados al aumento de la permeabilidad endotelial e infiltración de fagocitos activados (Breitbart et al., 1990), donde por cierto, poseen un rol fundamental el proceso inflamatorio que se establece posterior al ejercicio (Gao et al., 2008). En un

protocolo con restricción temporal de la circulación (isquemia y reperfusión) se evidenció un aumento del malondialdehído plasmático (Rodríguez et al., 2003).

El daño oxidativo por ejercicio puede sufrir modificaciones en su presentación según las modalidades de ejercicio en cuanto a la intensidad (anaeróbico/aeróbico), duración y sus combinaciones. En los siguientes párrafos se describen los principales hallazgos a este respecto:

a) Ejercicio anaeróbico: contradiciendo la hipótesis inicial de que el daño oxidativo estaba relacionado con el mayor consumo de oxígeno propio de los ejercicios aeróbicos, también en los ejercicios anaeróbicos se han encontrado evidencia de aumento de los marcadores de daño oxidativo. En un modelo de ratas se evidenció aumento del daño oxidativo a proteínas medidos como grupos carbonilos post ejercicio de alta intensidad breve (Radak et al., 1998). Groussard et al., 2003 encontró tras un test de Wingate, incrementos en el ácido úrico plasmático. En la misma prueba evidenció aumento de radicales derivados de lípidos detectados en plasma por resonancia de espín (Groussard et al., 2003). Shi et al., 2007 mostró evidencia de aumentos tardíos (horas) de 8-hidroxideoxiguanosina y 4-hidroxi-2-nonenal como indicadores de aumento del daño oxidativo a los ácidos nucleicos y lipídoperoxidación respectivamente.

b) Ejercicio aeróbico agudo prolongado: corresponde a uno de los protocolos más estudiados; ya que, en teoría, este tipo de ejercicio debía ser un gran generador de un desequilibrio oxidativo (Duthie et al., 1982). En carrera de fondo atlético, Child et al., 1998 analizando corredores de fondo (prueba de 21 km) encontraron aumento del TBARs y de la capacidad antioxidante plasmática. Similares resultados se han reportado en corredores de maratón, con incrementos en la TBARs plasmáticos y de 8-hidroxideoxiguanosina en leucocitos periféricos (Tsai et al., 2001). En otro reporte, no se evidenciaron variaciones de la vitamina C, mientras se observó aumentos de la concentración de ácido úrico en sujetos que participaron de una marcha de 130 kilómetros (Chevion et al., 2003). En ejercicios más prolongados (carrera de seis días) se ha reportado disminución las defensas antioxidantes; baja en la concentración de beta caroteno, retinol y luteína, mientras se observó una disminución de la actividad de superóxido dismutasa intraeritrocitaria (Machefer et

al., 2004). En una prueba de cuatro días de duración (300km aproximadamente) se encontró aumento de la oxidación de las proteínas medido como carbonilos y nitrotirosina en plasma y orina (Radák et al., 2003).

c) **Ejercicio crónico:** corresponde al efecto del entrenamiento de moderada a baja intensidad. El principal hallazgo en este campo es la inducción de la red contenedora de sustancias antioxidantes; al respecto, Ashton et al., 1999, reportaron un incremento de la capacidad antioxidante del plasma. Lawler et al., 1999 determinaron un incremento de la expresión y actividad de la superóxido dismutasa en ventrículo izquierdo de ratas. Luego de un entrenamiento de moderada a baja intensidad (24 y 50 semanas respectivamente) en ratas, se observó una menor concentración de TBARs y de carbonilos en membranas mitocondriales (Boveris y Navarro, 2008). En pacientes obesos disminuyó el F₂-isoprostanos plasmático tras un año de entrenamiento aeróbico (Cambell et al., 2010). Respecto a los mecanismos de estas modificaciones se piensa que el incremento de pro-oxidantes de poca cuantía en forma repetida es un factor favorable, ya que induce una mejoría de las defensas antioxidantes (Ji. 2008), llevando a varios investigadores a sugerir la aplicación del concepto de hormesis para la inducción de las defensas antioxidantes por ejercicio (Ji et al., 2006) , además se ha generado un gran cuerpo de información que actualmente estudia las vías de señalización intracelular que explican este fenómeno; de esta forma se ha establecido que frente al ejercicio se inducen principalmente las vías de transducción intracelulares de NF-κB y de las MAP kinasas (Ji et al., 2006; Powers et al., 2011).

DAÑO OXIDATIVO COMO FACTOR ETIOPATOGÉNICO EN LAS ENFERMEDADES PULMONARES

La generación de estrés oxidativo ha sido identificado como un factor involucrado en el desarrollo y evolución de diversas patologías pulmonares entre las que pueden contarse el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la fibrosis pulmonar (Walters et al., 2008) y el cáncer pulmonar (Comhair y Erzurum, 2002; Merker et al., 2000). El pulmón aparece como especialmente sensible a los daños por oxidación, ya que posee una gran superficie de exposición a variadas noxas exógenas como el cigarrillo, el material en partículas y otros gases contaminantes ambientales como óxidos de nitrógeno y óxidos de azufre (Roberts et al., 2007). Eventualmente también puede ser blanco de daño mediado por activación de la cascada de la inflamación, con la secundaria llegada de células inflamatorias que liberan enzimas degradativas y radicales libres que favorecen el desarrollo de daño al tejido pulmonar (Biswas y Rahman, 2009). El daño oxidativo asociado a la inflamación muestra una gran variabilidad de intensidad, desde inflamaciones imperceptibles para los sujetos, hasta cuadros que pueden ser causa de falla pulmonar aguda como en el síndrome de distress respiratorio del adulto (Chow et al., 2003).

La acción de pro-oxidantes en forma directa (liberados por leucocitos polimorfonucleares, ozono) o generados en forma secundaria, constituye un reto para las defensas antioxidantes pulmonares, las que aparte de las enzimas antioxidantes constan de una importante cantidad de antioxidantes no enzimáticos presentes en el fluido epitelial que cubre los alvéolos y las vías aéreas (Morrison et al., 2006). De particular importancia como antioxidantes no enzimáticos en este órgano aparece la vitamina E (Yamaoka et al., 2008) y el glutatión (Biswas y Rahman, 2009). En el caso que las defensas antioxidantes sean superadas por los pro-oxidantes se establece un estrés oxidativo pulmonar secundario (Stone, 2000; Cross et al., 2002). El estrés oxidativo pulmonar ha sido relacionado en estudios epidemiológicos con la función pulmonar en la población general; con correlaciones inversas entre el % VEF₁ y la concentración plasmática de glutatión. Similar correlación fue vista entre % VEF₁ con la lipoperoxidación plasmática. En este mismo estudio se encontró una correlación positiva del % VEF₁ con la actividad de una enzima antioxidante como la

glutación peroxidasa (Och-Blacom et al., 2005). Los antecedentes descritos previamente se resumen en la figura 6.

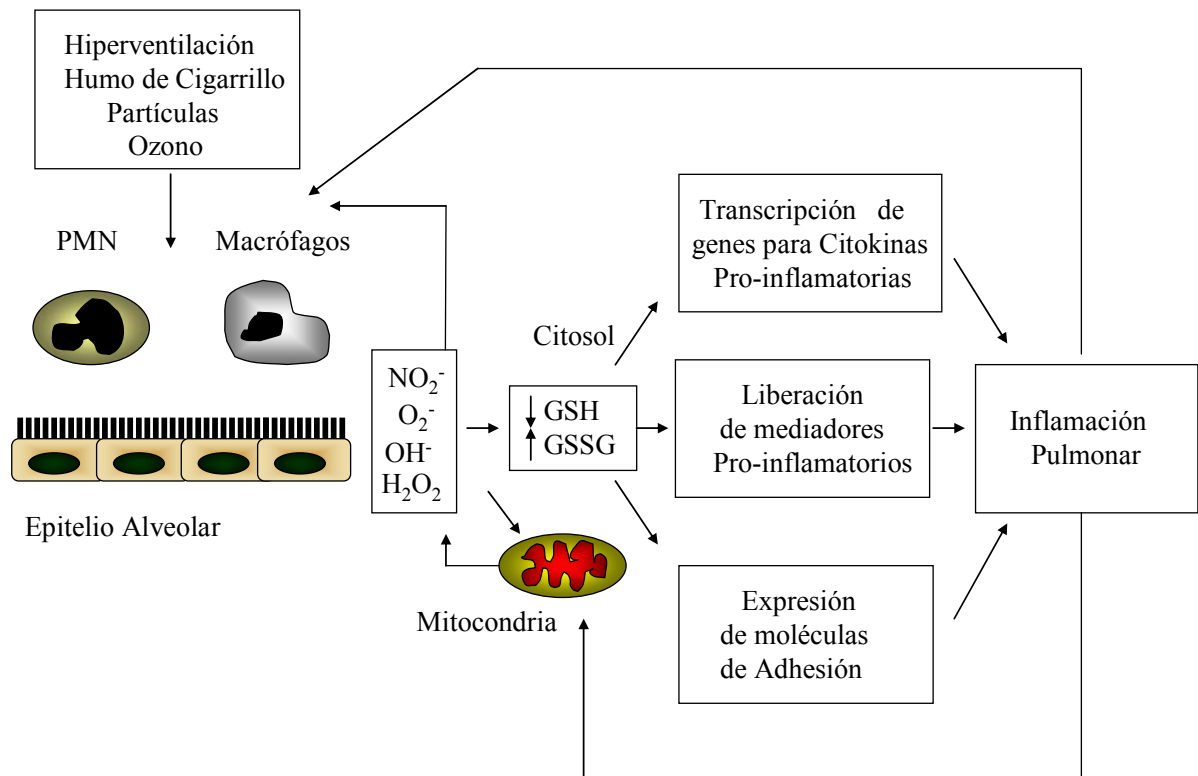


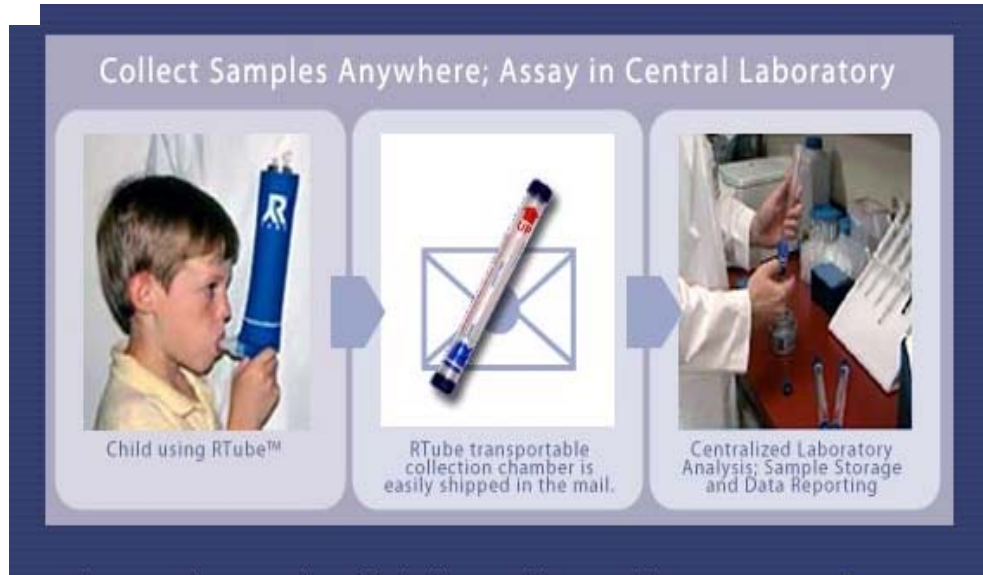
Figura 6. Mecanismo general hipotético respecto a las modificaciones fundamentales que sucederían en el microambiente pulmonar en sujetos expuestos a condiciones o sustancias que conducen al desarrollo de daño oxidativo en este órgano. Adaptado de Rahman y McNee Eur Res Journal 2000; 1616(3):534-554.

ESTUDIO DEL AIRE ESPIRADO CONDENSADO

En los últimos años el análisis del aire espirado condensado ha sido propuesto como un método no invasivo de estudio de las enfermedades pulmonares (Hunt, 2007). Esta herramienta ha sido aplicada desde la búsqueda de los mecanismos, hasta la realización de seguimientos clínicos de las más variadas patologías pulmonares. Con este objetivo, múltiples son los parámetros que se han determinado en muestras de EBC, como se muestra en la figura 9. Las determinaciones realizadas corresponden principalmente a indicadores de inflamación, remodelación y daño oxidativo tisular (Horváth et al., 2005; Kharitonov y Barnes, 2006). El aire espirado es devuelto al ambiente desde el pulmón con una temperatura cercana a los 37°C y saturado con agua junto con productos del metabolismo y derivados de la superficie epitelial pulmonar. El enfriamiento del aire espirado por los aparatos condensadores captura una parte de él a través de un sistema de mangueras y tubos que ofrecen baja resistencia a la respiración. El producto de este proceso, tras unos 15 minutos, consiste en cerca de 1 ml de una sustancia líquida y transparente, compuesta por más de un 90% de agua y que además contiene tanto partículas volátiles como no volátiles que se encuentran en concentraciones hasta el rango de micromoles por litro. Para la obtención de muestras de EBC se han desarrollado aparatos comerciales (Rosias et al., 2008), entre los que destacan por su amplio uso RTubeTM de Respiratory Research Inc., Charlottesville, VA, USA (figura 7A) y ECoScreen de Jaeger GmbH, Hoechberg, Alemania (figura 7B), sin embargo existen también varios modelos contruidos por los propios investigadores (figura 8) para uso general (van Beurden et al. 2002), así como para ser utilizados en condiciones experimentales y clínicas particulares como ventilación mecánica (Walsh et al., 2006) o para obtener muestras en lactantes (Moeller et al., 2006). El análisis del aire espirado condensado, es una herramienta de gran atractivo por ser no invasiva, permitir la obtención de múltiples muestras y no requerir equipos sofisticados, haciéndolo muy apto para el trabajo de campo (Horváth et al., 1998; Loukides et al., 2002; Mutlu et al., 2001; Nowak et al., 2001). Un particular polo de aplicación de esta metodología, es el estudio de patologías que tienen asociadas anomalías del estado redox pulmonar como el tabaquismo (Garey et al., 2004), fibrosis quística (Montuschi et al., 2000), asma (Horváth et al., 1998),

bronquiectasias (Loukides et al., 2002) y enfermedades intersticiales (Montuschi et al., 1998) donde esta metodología ha sido utilizada.

A



B



Figura 7. Equipos utilizados para la obtención de aire espirado condensado de distribución comercial RTube™ (A) y ECoScreen (B).

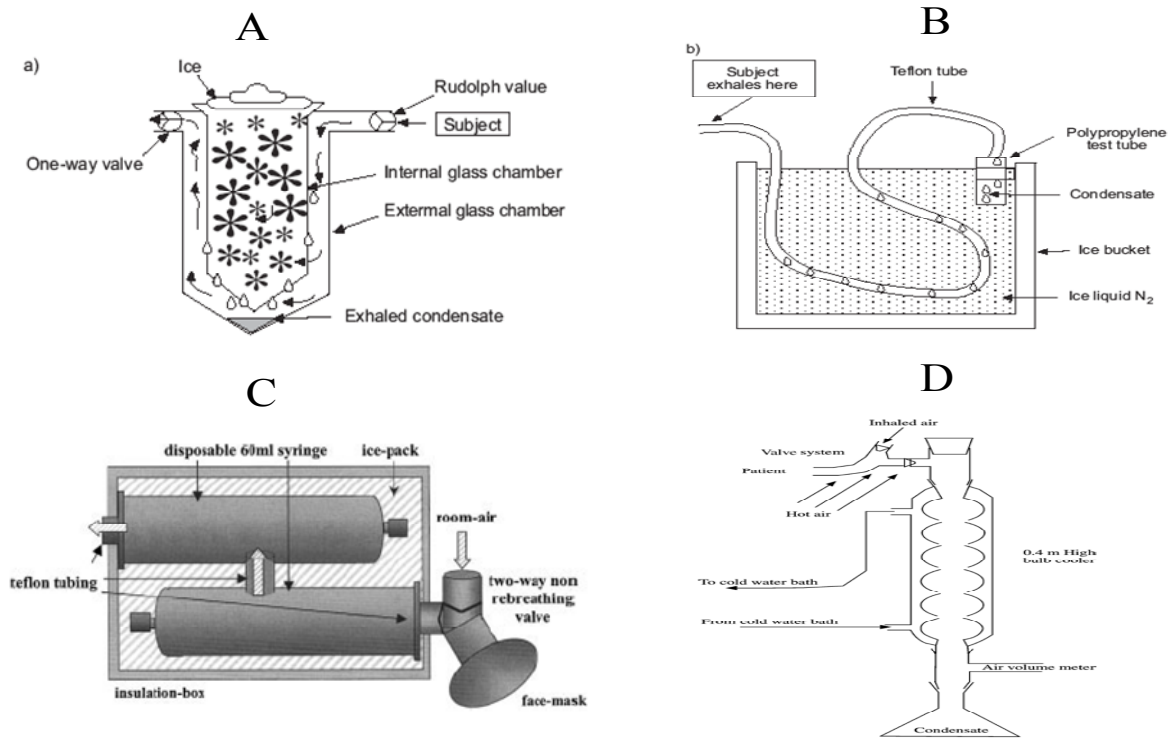


Figura 8. Equipos condensadores de EBC descritos en la literatura no comerciales. A; descrito por Horváth et al. 1998 B: descrito por Mutlu et al. 2001 C: descrito por Moeller et al 2006 y D: descrito por van Beurden et al 2002.

Peróxido de Hidrógeno
 Nitritos/Nitratos
 Malondialdehído
 8-isoprostanos
 Citoquinas
 Derivados del ácido araquidónico
 Leucotrienos
 Amoniac/amonio
 pH

Figura 9. Principales sustancias determinadas en muestras de aire espirado condensado.

2. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS

El ejercicio físico aeróbico implica la generación de un estado de desequilibrio del estado redox del organismo; se ha reportado un incremento de la generación de pro-oxidantes y en algunas situaciones alteración de los sistemas antioxidantes. El daño oxidativo pulmonar asociado al ejercicio ha sido poco estudiado en humanos ante la dificultad de obtener muestras de este órgano por métodos seguros para los pacientes. El análisis del aire espirado condensado ofrece la oportunidad de poder estudiar de manera no invasiva los efectos de las carreras de larga distancia sobre parámetros indicadores del estado redox y marcadores de inflamación de este órgano.

HIPÓTESIS

La realización de ejercicio aeróbico prolongado aumenta las concentraciones de pro-oxidantes, indicadores de daño oxidativo e inflamación pulmonar en muestras de aire espirado condensado.

HIPÓTESIS ALTERNA

La realización de ejercicio aeróbico prolongado no aumenta las concentraciones de pro-oxidantes, indicadores de daño oxidativo e inflamación pulmonar en muestras de aire espirado condensado.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el estado redox pulmonar, a través del análisis de muestras de aire espirado condensado, en sujetos que realizan ejercicio aeróbico prolongado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la concentración de marcadores de pro-oxidantes y daño oxidativo en humanos que participan en carreras de fondo atlético (10, 21 y 42 kilómetros).
2. Determinar el efecto del tiempo de la carrera sobre la generación de pro-oxidantes y daño oxidativo en carreras de fondo atlético (10, 21 y 42 kilómetros).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRA

Todos los participantes en el estudio eran corredores aficionados (tabla 1), no fumadores, sin antecedentes de enfermedades del tracto respiratorio alto o bajo en el último mes, no tenían antecedentes de enfermedades crónicas del sistema respiratorio (asma y rinitis alérgica). Tampoco eran usuarios de suplementos nutricionales, antioxidantes ni anti-inflamatorios. Los participantes obtuvieron información verbal y por escrito, además firmaron un consentimiento informado (Anexo 1) y completaron un cuestionario para realizar una descripción de sus características como corredores (Anexo 2). Este estudio fue aprobado por el comité de ética de investigación de la Universidad de Valparaíso (Anexo 3). Las muestras fueron obtenidas en seis carreras de resistencia entre los años 2007 y 2010 en Santiago de Chile en las categorías de 10 km (10K), 21.1 km (21K) y 42.2 km (42K) respectivamente. Los detalles de las condiciones climáticas y de las concentraciones de los contaminantes del aire de cada carrera se resumen en la tabla 2. Durante las carreras se tomaron muestras de EBC 30 minutos antes (30 pre), a los 20 minutos (20 post) y a los ochenta minutos de terminada la prueba (80 post). Todos los corredores eligieron la prueba en que participaron.

La toma de muestras de EBC (figuras 10, 11, 12 y 13) fue llevada a cabo mediante el aparato previamente descrito y validado (Araneda et al., 2005; Araneda y Salazar, 2009). Utilizando este condensador de aire espirado, se reportó valores similares a los obtenidos con otros aparatos en sujetos sanos en la concentración de H_2O_2 , NO_2 y pH. Para detalles ver tabla 3.

La toma de muestras fue realizada estando los corredores sentados utilizando un clip nasal. Previamente se habían lavado la boca con agua destilada. El tiempo de la toma de muestra fue de 15 minutos aproximadamente o hasta que se obtuvieran 1.5 ml. Una vez obtenidas las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido y posteriormente a -80 grados Celsius hasta su análisis. Debido a que algunas muestras no alcanzaron un volumen suficiente, en esos casos no fue posible realizar todas las determinaciones químicas (ver resultados).

Tabla 1. Principales características de los sujetos participantes del muestreo de EBC en corredores de larga distancia

	10K	21K	42K
Hombres/Mujeres	14/4	7/5	12/5
Edad (años)	27.5±10.4	36.7±8.6	38.2±8.3
Peso (kilos)	63.2±6.2	63.4±13.1	65.2±8.6
Altura (centímetros)	171.1±6.6	168.0±10.0	169.5±6.4
Entrenamiento (km/semana)	33.9±29.8	50.3±24.4	59.2±18.3 ^a
Máxima distancia corrida (km)	23.6±22.1	31.5±11.0	45.4±14.1 ^a
Tiempo de carrera (segundos)	3146±467	6090±880 ^{a, b}	14793±2693 ^a

Los valores se expresan como media±DE. ^a p< 0.05 diferente del grupo 10K. ^b p< 0.05 diferente del grupo 42K.

Tabla 2. Número de sujetos, variables climáticas y concentración de contaminantes de las seis pruebas en las que se realizó el muestreo de EBC en corredores de larga distancia.

	Carrera 1	Carrera 2	Carrera 3	Carrera 4	Carrera 5	Carrera 6
10K:21K:42K	0:4:0	0:2:4	5:3:0	0:1:5	2:2:8	11:0:0
Estación	Primavera	Otoño	Invierno	Otoño	Otoño	Primavera
Temperatura °C	27.4	22.0	14.5	22.0	14.3	15.6
Humedad (%)	83	75	55	44	80	34
O₃ (ppb)	38.8	35.4	10.6	34.8	9.7	30.6
NO₂ (ppb)	16.4	32.0	39.4	23.2	23.1	5.1
CO (ppm)	0.4	0.4	0.4	0.6	0.5	0.2
MP₁₀ (µg/m³)	42.6	57.5	80.8	64.2	85.9	6.6
SO₂ (ppb)	3.2	2.5	no data	4.1	1.5	no data

Los datos fueron obtenidos de la red monitoreo de la calidad del aire de la región metropolitana (MACAM-II) de Santiago de Chile.

Tabla 3. Concentraciones de H₂O₂, NO₂ y pH de muestras de EBC obtenidas con el condensador de aire espirado descrito y valores tomados de la literatura de muestras conseguidas con otros condensadores.

Parámetro	Condensador descrito	Valor de la literatura
H₂O₂ (μM)	0.53±0.55; (n=26)	0.45±0.29; (n=12)
NO₂ (μM)	1.59±1.00; (n=17)	1.8±0.3; (n=10)
pH	7.69±0.24;(n=37)	7.8±0.6;(n=122)

Los valores obtenidos con el condensador descrito se obtuvieron a partir de muestras de hombres sanos no fumadores entre 18 a 35 años, sentados y en reposo utilizando como sistema enfriante una mezcla de hielo con sal. Los resultados son expresados como media±DE. Los valores de sujetos sanos fueron extraídos de Nowak et al., 2001 para H₂O₂, Nightingale et al., 1999 para NO₂ y Paget-Brown et al., 2006 para pH.

EQUIPO DE OBTENCIÓN DE EBC

El aire espirado condensado fue recolectado con un equipo construido por el doctorando, consistente en una mascarilla de nebulización conectada un sistema de válvulas de una vía. En este equipo se adaptaron dos válvulas de 22 mm de diámetro, números de catalogo 1664 y 1665 (Hudson RCI, USA). Esto se conecta a un tubo corrugado de 15 cm de largo y 22 mm de diámetro interno, número de catalogo 60-50-150-1 (VBM Medizintechnik 39age, Alemania), que se encuentra cubierto por un calefactor flexible que lo mantiene a 37 grados Celsius con objeto de reunir el máximo de muestra. El tubo corrugado se encuentra unido a un condensador de vidrio con forma de Y con dos brazos superiores de 120 mm de largo en ángulo de 45 grados, con diámetro interno de 8 mm y un brazo inferior de 40 mm de largo donde se inserta a presión un tubo de plástico estéril de 2 ml (Eppendorf) que recoge la muestra. El condensador se encuentra sumergido en hielo a -5°C (figuras 12 y 13).

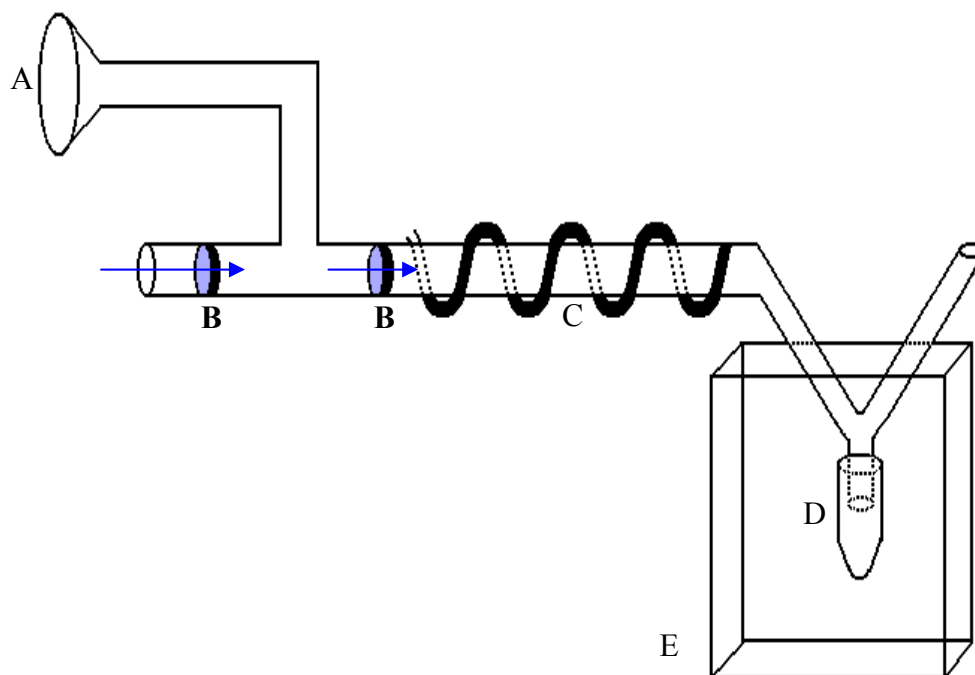


Figura 10. Esquema general del dispositivo diseñado para obtener muestras de aire espirado condensado. A: mascarilla o boquilla, B= Válvulas unidireccionales, C=calefactor eléctrico flexible, D=tubo plástico, E= sistema enfriante que puede ser hielo, hielo seco o gel enfriante.

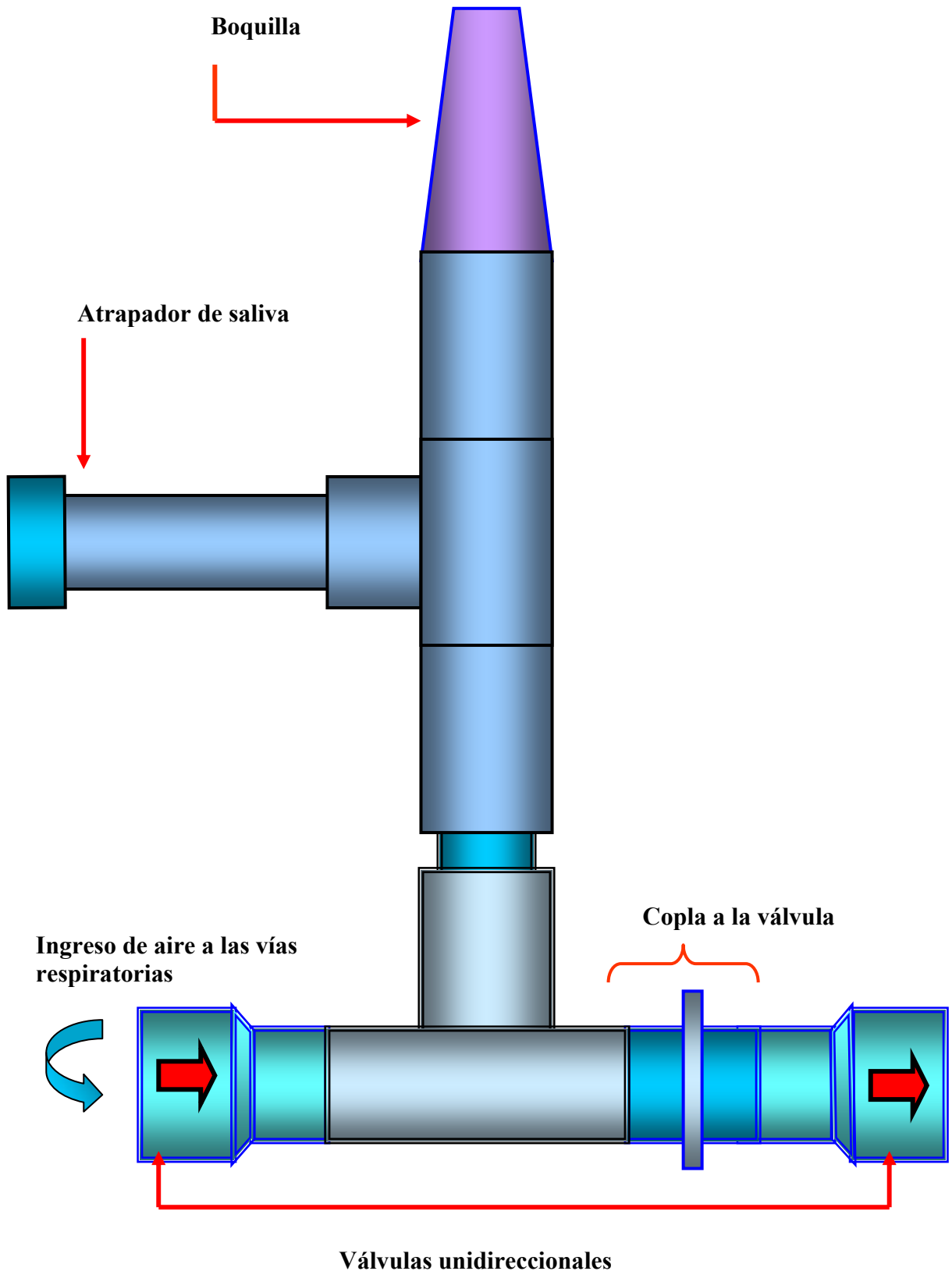


Figura 11. Detalle del dispositivo diseñado para obtener muestras de aire espirado condensado donde se esquematiza el sistema de boquilla, el atrapador de saliva y las válvulas unidireccionales. El óptimo funcionamiento se obtiene con el sujeto manteniendo el aparato por el atrapador de saliva y de esta forma dejando que el aire ascienda para ser coleccionado, con este método se evita la contaminación con saliva.

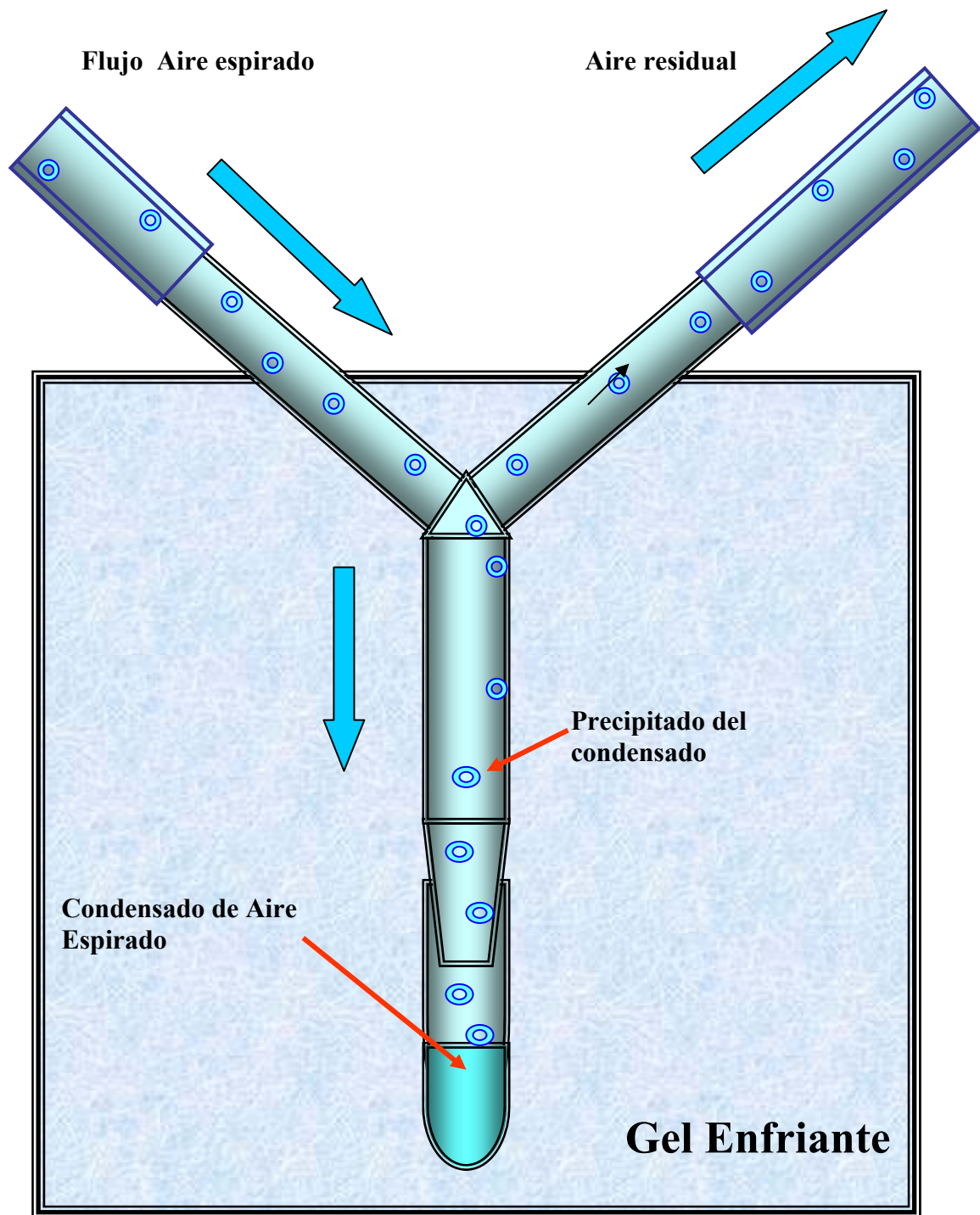


Figura 12. Detalle del dispositivo diseñado para obtener muestras de aire espirado condensado donde se esquematiza el sistema de condensación. La forma en "V" del condensador de vidrio permite la mayor captura de aire para ser condensado.

PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS DE EBC

Estando los sujetos cómodamente sentados, en reposo de 5 minutos y con una pinza de bloqueo nasal (figura 13). No recibieron alimento una hora antes de la obtención de las muestras. El tiempo total de recolección en estas condiciones fue de 15 a 20 minutos o hasta que el sujeto completó 1.5 ml aproximadamente. Para evitar las potenciales variaciones circadianas, las muestras fueron obtenidas entre las 9:00 y las 12:00 AM para los protocolos 1 y 2.



Figura 13. Recolección de una muestra de aire espirado condensado. Estando el sujeto cómodamente sentado, tras haberse lavado la boca con agua destilada y usando un clip nasal. El sujeto toma el aparato condensador por el atrapador de saliva y el aire fluye teniendo los tubos que conectan la boquilla al condensador en posición vertical para evitar la contaminación con saliva, con el mismo fin el sistema enfriante se encuentra sobre el nivel de la boca.

DETERMINACIÓN QUÍMICA DE [MDA]_{EBC}

Fue realizado utilizando la reacción con ácido tiobarbitúrico (figura 14) según Larstad et al., (2002) con mínimas modificaciones. A 300 µl de aire condensado ó 50 µl de suero se agregaron 100 µl de ácido tiobarbitúrico 25mM. Esta mezcla fue incubada a 95 grados Celsius durante una hora, luego esta mezcla fue enfriada en hielo durante cinco minutos y posteriormente incubada a temperatura ambiente durante cuarenta minutos, para finalmente determinar su concentración mediante HPLC (Shimadzu LC10AD, Corporation, U.S.A.), utilizando una columna C-18, 150 mm de largo y 4,6 mm I.D. (Supelcosil LC-18, Supelco, U.S.A) con detector fluorescente (RF-551, Shimadzu, U.S.A.) a una onda de excitación 532 y emisión 553. Se utilizó una fase móvil de acetonitrilo/20 mM buffer fosfato de potasio 20:80 (v/v), pH 6,8 a un flujo de 1.0 ml/min. Durante cada medición se prepararon blancos, mezclando TBA con agua destilada (figura 15), muestras, en las que el TBA fue mezclado con el EBC (figura 16) y el estándar donde TBA fue mezclado con Malondialdehído-bis-dietylacetal (figura 17).

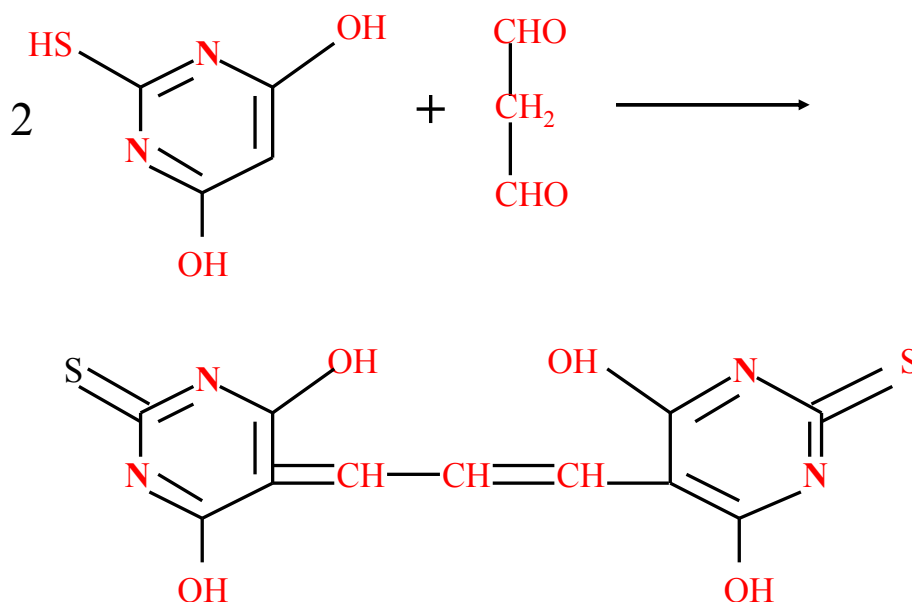


Figura 14. Reacción utilizada para la determinación de MDA en EBC a través de la utilización del ácido tiobarbitúrico.

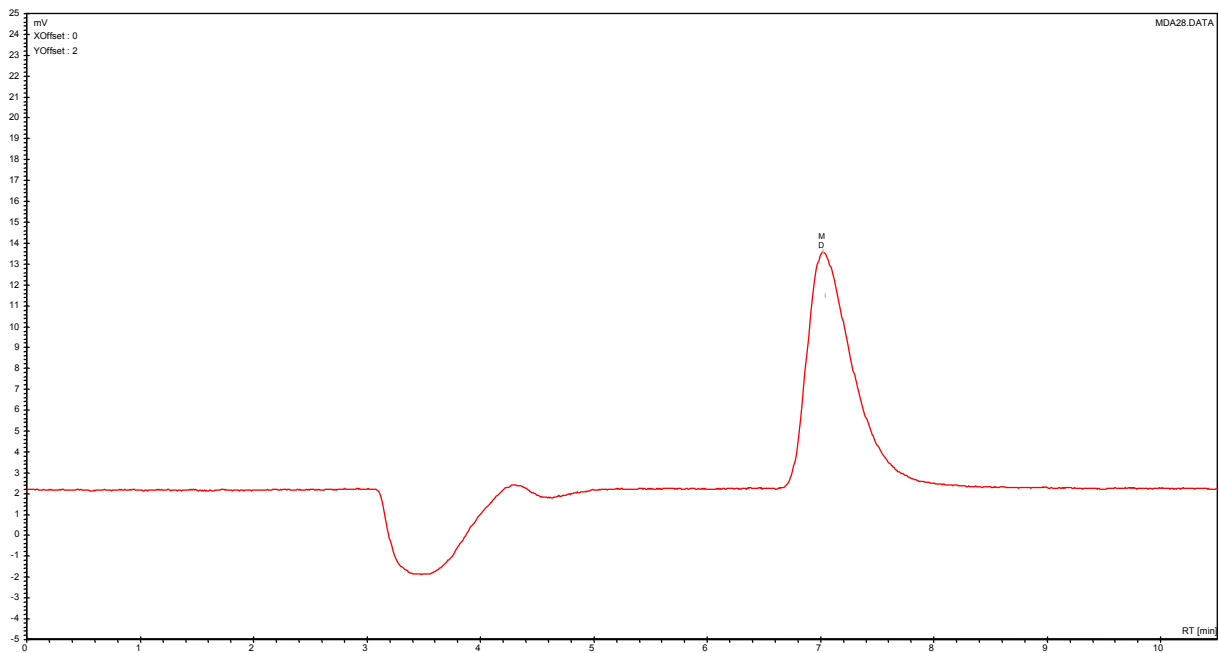


Figura 15. Cromatograma que representa la determinación de MDA de un blanco.

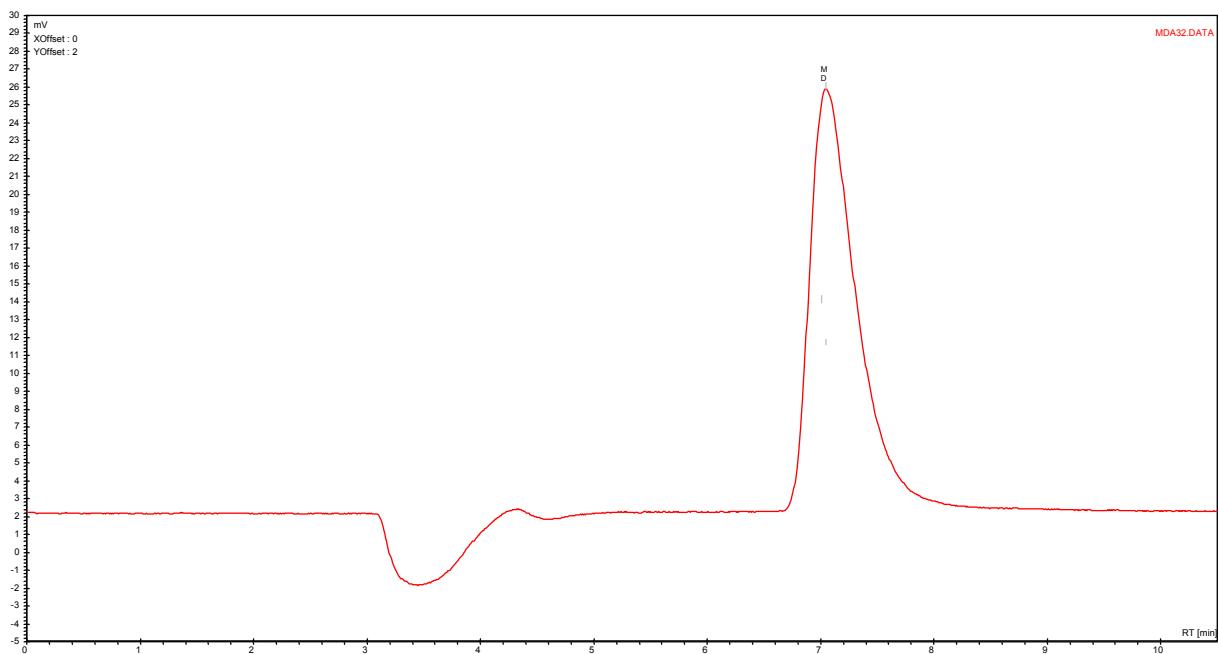


Figura 16. Cromatograma que representa la determinación de MDA en una muestra EBC

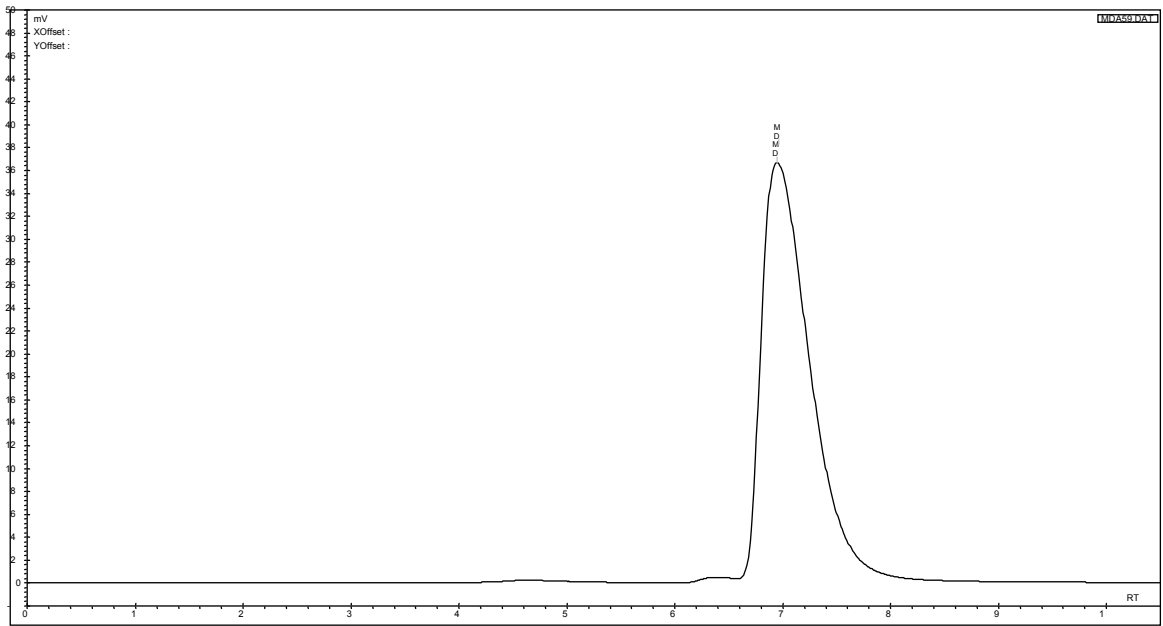


Figura 17. Cromatograma que representa la determinación de MDA de un standard.

DETERMINACIÓN QUÍMICA DE [H₂O₂]_{EBC}

Fue medido utilizando el reactivo de FOX₂, cuya reacción se describe en la figura 18. El reactivo de FOX₂ fue preparado un 10% más concentrado de lo descrito por Nourooz-Zadeh et al. 1994, además se le adicionó sorbitol según (Gay y Gebicki, 2000). Se utilizaron 350 µL del EBC y se agregaron 150 µL del reactivo de FOX₂ modificado, luego se incubó una hora a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 560 nm (Jenway 6405, U.K.). Para cada medición se realizaron tres curvas de calibración (figura 19) con H₂O₂ de Merck (Germany) como estándar. Utilizando este método se han obtenido valores similares a los reportados en la literatura en sujetos sanos (tabla 3).



Figura 18. Reacción utilizada para la determinación de H₂O₂ utilizando como medio ácido el ácido perclórico. Esta reacción origina iones férricos que reaccionan con el indicador anaranjado de xilenol y forman un complejo que vira a color azul y absorbe a 560nm

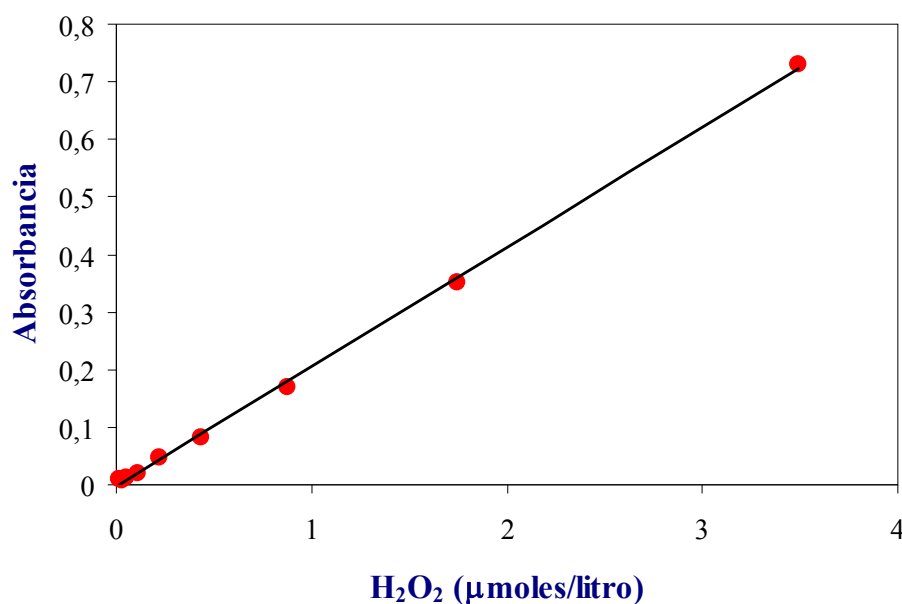


Figura 19. Curva de calibración para la determinación de peróxido de hidrógeno utilizando el método espectrofotométrico de FOX₂ modificado.

DETERMINACIÓN QUÍMICA DE $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$

La concentración de nitritos fue medida utilizando el ensayo espectrofotométrico basado en la reacción de Griess (Green et al., 1982). A 300 μL de EBC se le adicionó 300 μL del reactivo de Griess (0.1% naphthylethylenediamine-dihydrochloride, 1% sulphanilamide, 3% H_3PO_4). Se incubó por diez minutos y se midió la absorbancia a 550 nm. Para cada medición se realizaron tres curvas de calibración (figura 20) con nitrito de sodio como estándar. Utilizando este método se han obtenido valores similares a los reportados en la literatura en sujetos sanos (tabla 3).

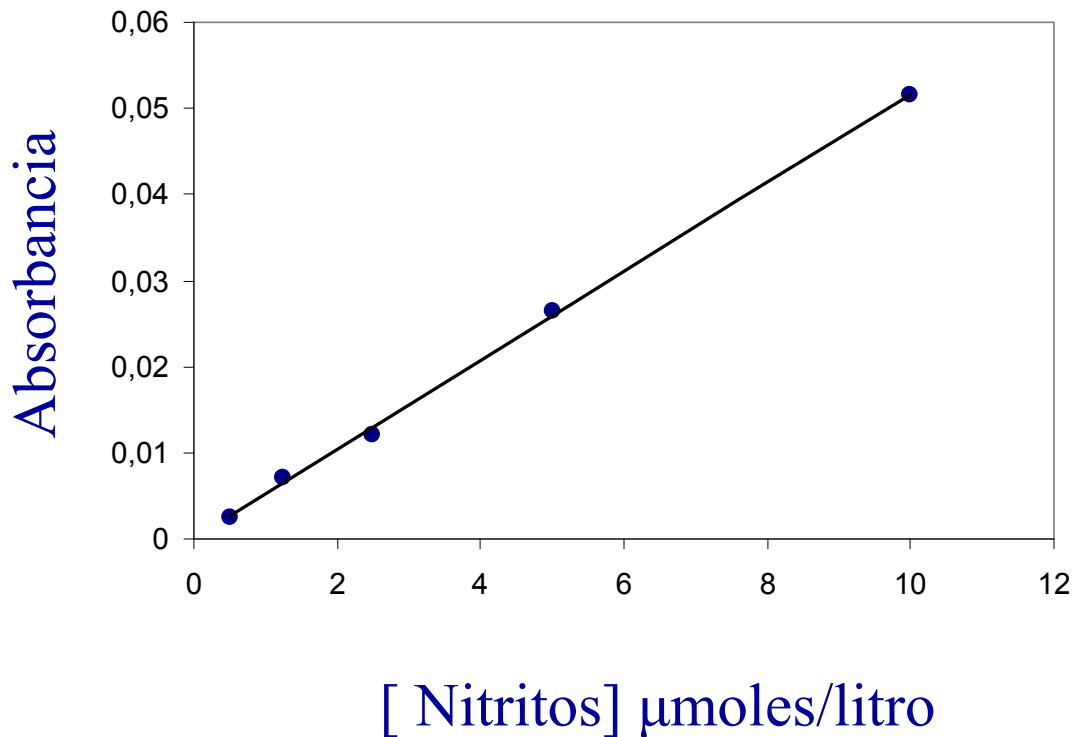


Figura 20. Curva de calibración para la determinación de nitritos utilizando a través de la reacción de Griess

pH EN EBC

Fue medido utilizando el protocolo de Pager-Brown et al., (2006). 100 μ L de EBC fueron burbujeados durante ocho minutos a un flujo de Argón de 350 mL/min (figuras 21 y 22) y posteriormente el pH fue medido utilizando un microelectrodo 3mm diámetro x 38 mm de largo (Cole and Palmer) conectado a un pH metro (Oakton[®] Acorn pH 6). Utilizando este protocolo se han obtenido valores similares a los reportados en la literatura en sujetos sanos (tabla 3).

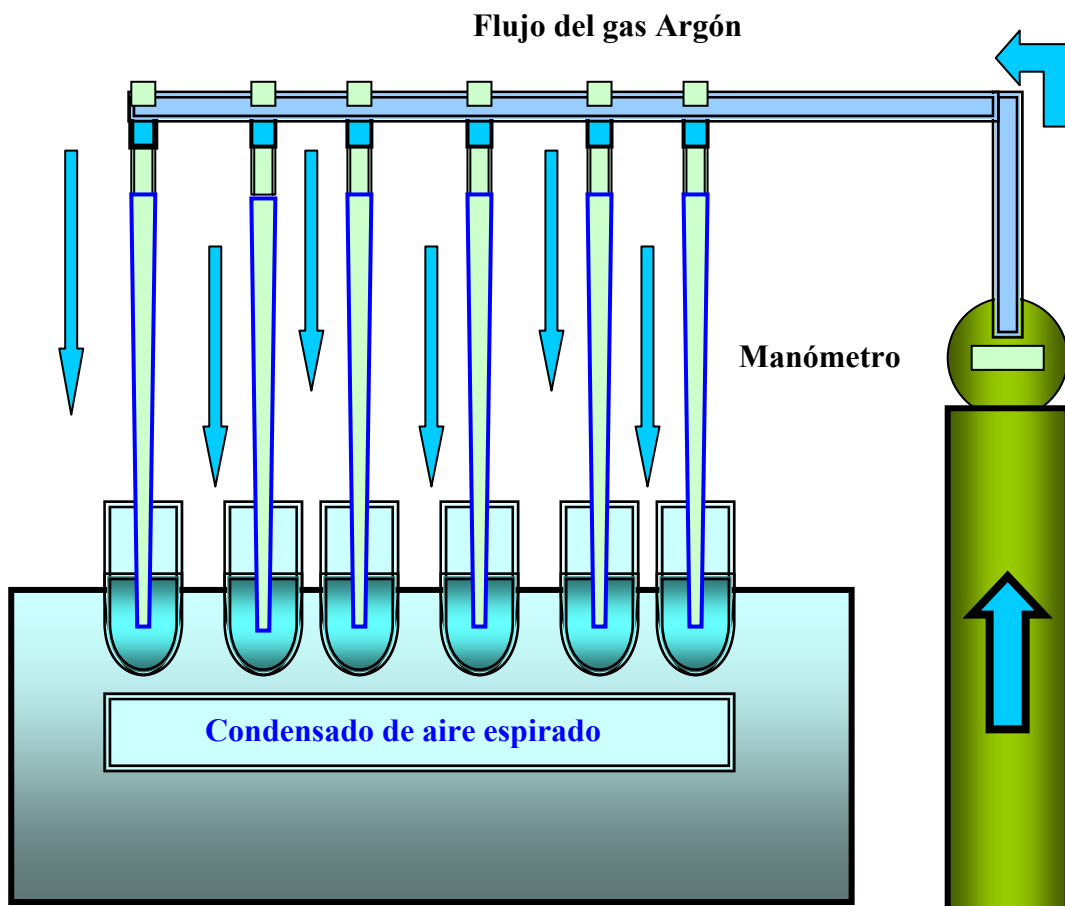


Figura 21. Esquema que representa la fase de la preparación de la muestra de EBC previa medición del pH. Se observan varios tubos con muestras de EBC sobre las cuales se está realizando el burbujeo con gas Argón.

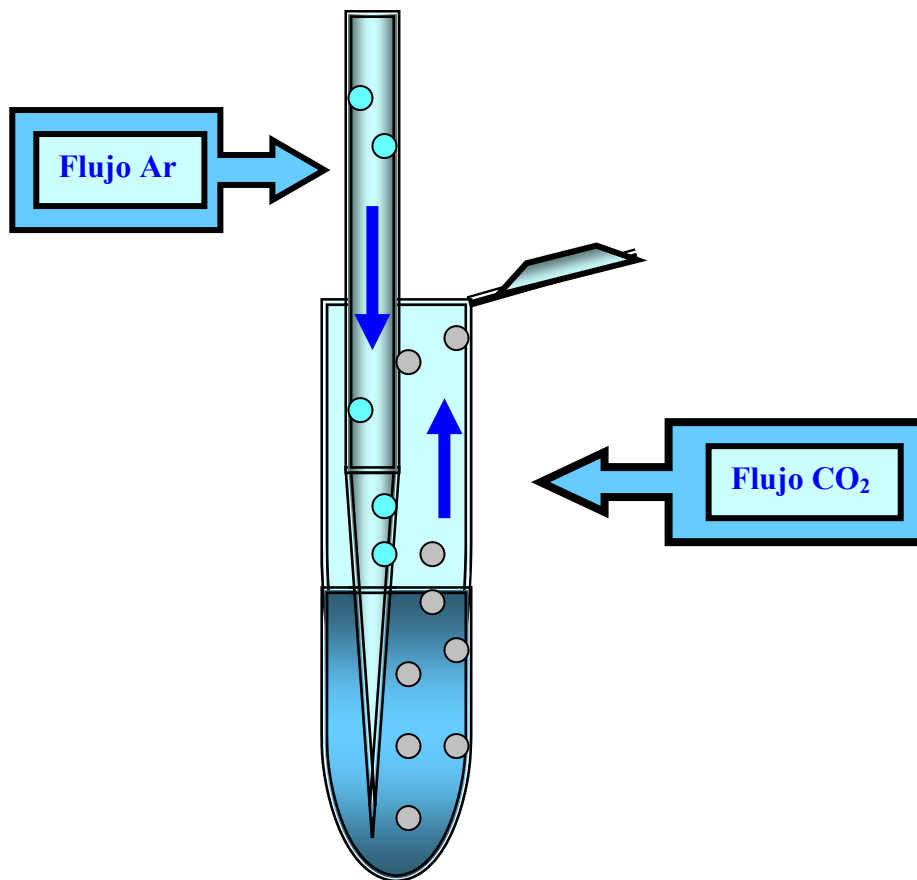


Figura 22. Representación de la fase de burbujeo de las muestras del aire espirado, lo que permite tras ocho minutos favorecer la salida del CO₂ y luego proceder a la medición de la muestra de EBC utilizando un microelectrodo de pH.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto del ejercicio dentro de cada grupo fue analizado con la prueba de Friedman para muestras repetidas utilizando la prueba de Dunn's como prueba a posteriori. Para comparaciones entre los valores basales de cada grupo se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis utilizando la prueba de Dunn's como prueba a posteriori. Las medias para la [MDA] fueron contrastadas usando la prueba de Mann-Whitney en los valores basales. Las correlaciones fueron estudiadas determinando el coeficiente de correlación de Spearman. El nivel de significancia utilizado fue de $p < 0.05$. Para realizar el análisis estadístico fue utilizado el software GraphPad Prism, USA.

ÍNDICES DE CALIDAD

a) ARTÍCULOS PUBLICADOS

Artículo 1: (Anexo 4)

Araneda OF, Salazar MP. Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate. *J Bras Pneumol* 2009; 35:69-72.

Brief Communication

Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate*

Diseño y evaluación de un equipo para obtener aire espirado condensado

Oscar Florencio Araneda Valenzuela, María Paulina Salazar Encina

Abstract

In recent years, the analysis of exhaled breath condensate samples has been given great weight as a noninvasive methodology of studying physiology and lung diseases. The present study describes a device for measuring exhaled breath condensate that is affordable, easily constructed, portable and suitable for use in the field, as well as allowing the collection of simultaneous samples. The results obtained with this device in terms of the concentrations of pH, hydrogen peroxide and nitrite, metabolites related to inflammatory and oxidative damage, in exhaled breath condensate samples are comparable to those obtained with other devices previously described.

Keywords: Exhalation; Lung diseases; Equipment design.

Resumen

El análisis de muestras de aire espirado condensado ha cobrado gran relevancia en los últimos años como método no invasivo de estudio de la fisiología y las enfermedades de origen pulmonar. En el presente trabajo se describe un equipo para tomar muestras de aire espirado condensado de bajo costo, fácil de fabricar, de transportar al terreno y que permite tomar muestras en forma simultánea. La concentración de metabolitos relativos a procesos inflamatorios y al daño oxidativo (pH, peróxido de hidrógeno y nitrito) de muestras de aire espirado condensado obtenido con este equipo son comparables a los reportados con otros previamente.

Descriptores: Espiración; Enfermedades pulmonares; Diseño de equipo.

In recent years, the analysis of exhaled breath condensate (EBC) has been proposed as a noninvasive methodology of studying lung diseases.⁽¹⁾ This tool has been used to search for mechanisms as well as to perform clinical follow-up of various pulmonary pathologies.^(2,3) Exhaled breath is returned to the environment at a temperature of approximately 37°C, being saturated with water together with metabolism products and lung epithelial surface derivatives. Cooling of exhaled air by condensers captures part of this exhaled air through a system of hoses and tubes that offer little resistance to respiration. The product of this process is a transparent liquid containing volatile and nonvolatile particles, the concentrations of which are expressed using measures as small as micromoles per liter. Commercial devices have been developed for collecting EBC samples. Among such devices, the most widely used are the RTube™ (Respiratory Research Inc., Charlottesville, VA, USA) and the ECoScreen (Jaeger GmbH, Hoehberg, Germany). However, there are various

models constructed by individual investigators for general use,⁽⁴⁾ as well as for use in specific situations such as mechanical ventilation⁽⁵⁾ or sample collection from suckling infants.⁽⁶⁾ The particular interest of the investigators of the present study was to develop an EBC condenser that is affordable and portable, as well as allowing the collection of simultaneous samples, use in several experimental situations and use in patients with pathologies of pulmonary origin, either in hospitals or in the field, for the follow-up evaluation of exercise tolerance, as well as the effects of air contaminants, altitude and work.

Description of the device

Figure 1 presents a model of the device.

1) Connection to the condenser: Patients can be connected to the condenser via a mouthpiece or a mask. Although the mask is better tolerated by subjects, the mouthpiece allows the formation of approximately

* Study carried out at the *Universidad Mayor* School of Medicine, Santiago, Chile.

Correspondence to: Oscar Araneda Valenzuela. Camino la Pirámide, 5750, Huechuraba, Santiago, Chile.

Tel 56 02 3281295. E-mail: oscar.aranedav@mayor.cl

Financial support: none.

Submitted: 17 February 2008. Accepted, after review: 26 May 2008.

Artículo 2: (Anexo 5)

Heinicke I, Boehler A, Rechsteiner T, Bogdanova A, Jelkmann W, Hofer M, Rawlings P, Araneda OF, Behn C, Gassmann M, Heinicke K. Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate. *Eur J Appl Physiol* 2009; 106:599-604.

Eur J Appl Physiol
DOI 10.1007/s00421-009-1014-9

ORIGINAL ARTICLE

Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate

Ilmar Heinicke · Annette Boehler · Thomas Rechsteiner · Anna Bogdanova · Wolfgang Jelkmann · Markus Hofer · Pablo Rawlings · Oscar F. Araneda · Claus Behn · Max Gassmann · Katja Heinicke

Accepted: 5 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Oxidative stress occurs at altitude, and physical exertion might enhance this stress. In the present study, we investigated the combined effects of exercise and moderate altitude on redox balance in ten endurance exercising

The contribution of Max Gassmann and Katja Heinicke who are the senior authors was equivalent.

I. Heinicke · A. Bogdanova · M. Gassmann · K. Heinicke
Vetsuisse Faculty and Zurich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), Institute of Veterinary Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

A. Boehler · T. Rechsteiner · M. Hofer
Division of Pulmonary Medicine, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

I. Heinicke · W. Jelkmann
Institute of Physiology, University of Luebeck, Luebeck, Germany

P. Rawlings · O. F. Araneda · C. Behn
Faculty of Medicine, Universidad Mayor, Santiago, Chile

C. Behn
Extreme Environments Laboratory, Program of Physiology and Biophysics, ICBM, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile

C. Behn
Faculty of Medicine, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

C. Behn
International Center for Andean Studies (INCAS), Santiago, Chile

K. Heinicke (✉)
Neuromuscular Center, Institute for Exercise and Environmental Medicine of Presbyterian Hospital, 7232 Greenville Ave. #435, Dallas, TX 75231, USA
e-mail: katjaheinicke@texashealth.org

biathletes, and five sedentary volunteers during a 6-week-stay at 2,800 m. As a marker for oxidative stress, hydrogen peroxide (H_2O_2) was analyzed by the biosensor measuring system EcocheckTM, and 8-iso prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α}) was determined by enzyme immunoassay in exhaled breath condensate (EBC). To determine the whole blood antioxidative capacity, we measured reduced glutathione (GSH) enzymatically using Ellman's reagent. Exercising athletes and sedentary volunteers showed increased levels of oxidative markers at moderate altitude, contrary to our expectations; there was no difference between both groups. Therefore, all subjects' data were pooled to examine the oxidative stress response exclusively due to altitude exposure. H_2O_2 levels increased at altitude and remained elevated for 3 days after returning to sea level ($p \leq 0.05$). On the other hand, 8-iso PGF_{2α} levels showed a tendency to increase at altitude, but declined immediately after returning to sea level ($p \leq 0.001$). Hypoxic exposure during the first day at altitude resulted in elevated GSH levels ($p \leq 0.05$), that decreased during prolonged sojourn at altitude ($p \leq 0.001$). In conclusion, a stay at moderate altitude for up to 6 weeks increases markers of oxidative stress in EBC independent of additional endurance training. Notably, this oxidative stress is still detectable 3 days upon return to sea level.

Keywords Hypoxia · Lung · Hydrogen peroxide · 8-iso prostaglandin F_{2α} · Glutathione

Introduction

Altitude training is frequently used by endurance athletes to improve competition performance at sea level (Levine and Stray-Gundersen 1997). Three to four weeks at moderate altitude is the minimal recommended period required to

Published online: 11 April 2009

 Springer

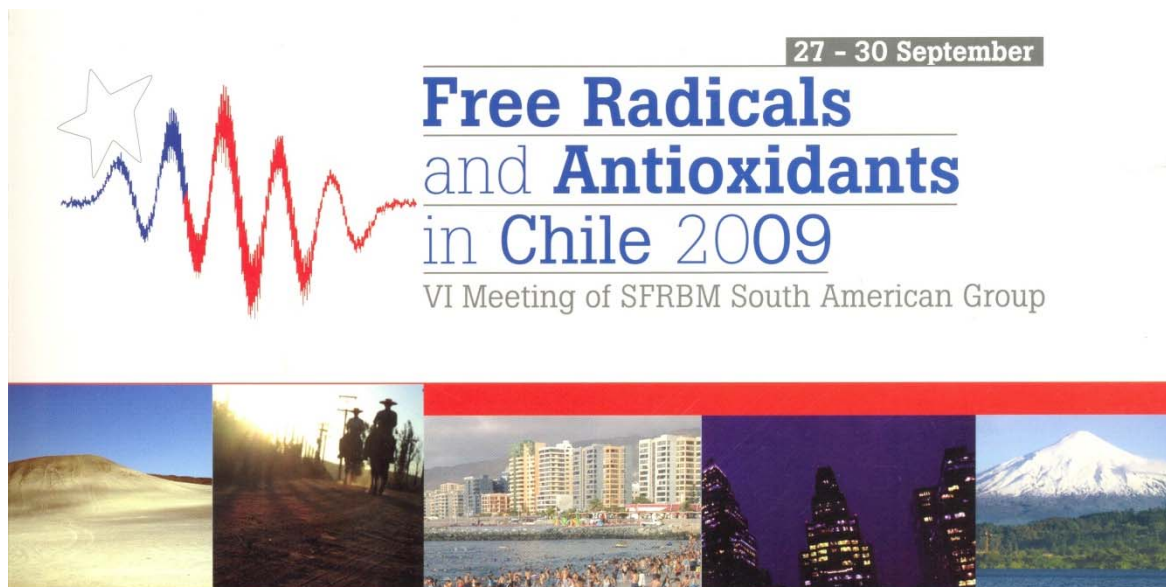
Artículo 3: (en revisión) (Anexo 6)

Araneda OF, Guevara AJ, Contreras C, Lagos N, Berral FJ. Exhaled breath condensate analysis after long distance races. Enviado a International Journal of Sports Medicine en Noviembre 2011.



b) PRESENTACIONES A CONGRESOS (Anexo 7)

"H₂O₂ in exhaled breath condensate (EBC) of long distance runners", de los autores; **O.F. Araneda**, A.J. Guevara, C.García, N. Lagos, C. Behn, presentado en el congreso internacional "Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009" del VI Meeting of SFRBM-South American Group.



4. RESULTADOS

El tiempo total de carrera en los sujetos que corrieron 10K fue de 3146 ± 467 segundos. Este fue menor al tiempo total del grupo de 21K; 6090 ± 880 segundos ($p < 0.05$) y respecto al grupo que corrió 42K; 14793 ± 2693 segundos ($p < 0.05$), este último grupo también mostró un mayor tiempo respecto al grupo de 21K ($p < 0.05$).

La $[H_2O_2]$ no mostró cambios significativos en el grupo de 10K ($p = 0.165$). La $[H_2O_2]$ aumentó en 20 post ($p < 0.01$) y 80 post ($p < 0.001$) respecto al valor pre en el grupo de 21K. El mismo parámetro mostró aumentos en 20 post respecto al pre en el grupo de 42K ($p < 0.01$). Existe una tendencia a la significancia ($p = 0.053$) al aumento de los valores basales de la $[H_2O_2]$ desde 10K hasta 42K (gráfico 1).

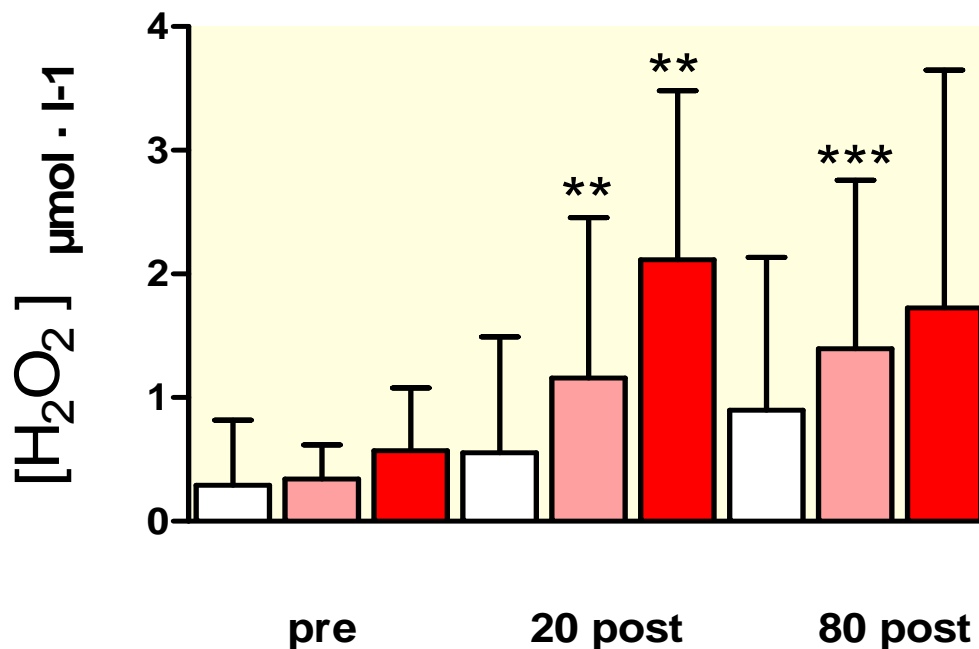


Gráfico 1. $[H_2O_2]$ en EBC en corredores de 10 (blanco, $n=18$), 21 (rosa, $n=12$) y 42 (rojo, $n=17$) kilómetros. El número de individuos se indica debajo de las barras del valor pre. Los valores son expresados como media \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ diferente respecto del basal para cada distancia analizada

La $[NO_2^-]$ en EBC no mostró cambios en el grupo de 10K ($p = 0.259$). En el grupo de 21K se observaron aumentos respecto al valor pre a los 20 post ($p < 0.05$) y 80 post ($p < 0.05$). Para el grupo de 42K también se observaron aumentos en 20

($p < 0.05$) post y 80 post ($p < 0.05$) respecto del valor pre. No se observaron diferencias (gráfico 1) en el valor pre entre grupos ($p = 0.211$) como se observa en el gráfico 2.

El pH no mostró diferencias dentro de los grupos estudiados. En los valores basales se observó una tendencia a la disminución desde 10K hasta 42K ($p = 0.068$) como se observa en el gráfico 3.

La [MDA] fue analizada en las mismas etapas solamente en un grupo de sujetos de 10K y 21K por muestra insuficiente. En este parámetro no se observaron diferencias dentro de cada grupo ni al compararlos entre sus valores basales (gráfico 4).

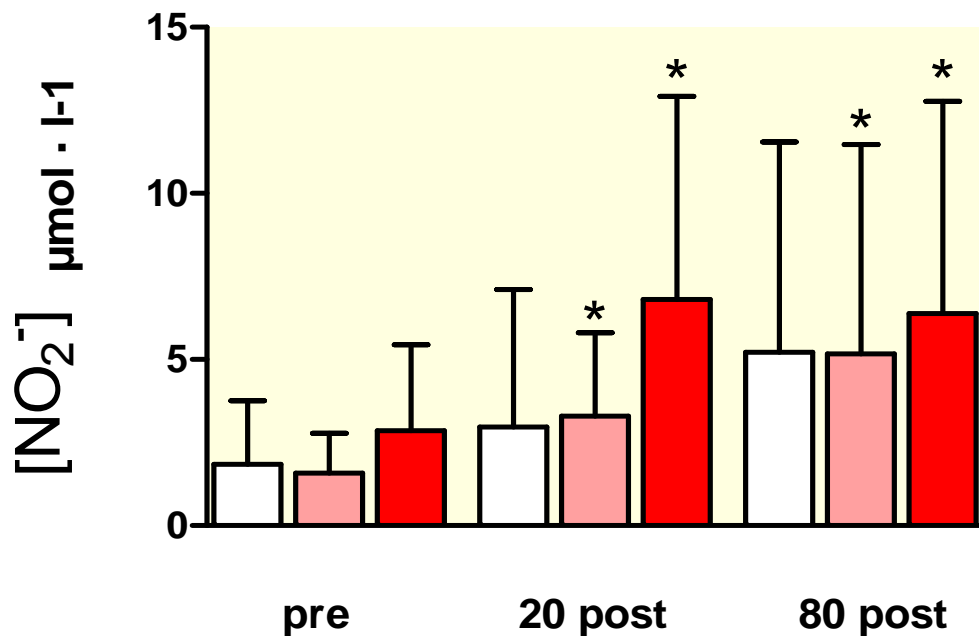


Gráfico 2. [NO₂⁻] en EBC en corredores de 10 (blanco, n=18), 21 (rosa, n=10) y 42 (rojo, n=16) kilómetros. El número de individuos se indica debajo de las barras del valor pre. Los valores son expresados como media ± DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ diferente respecto del basal para cada distancia analizada

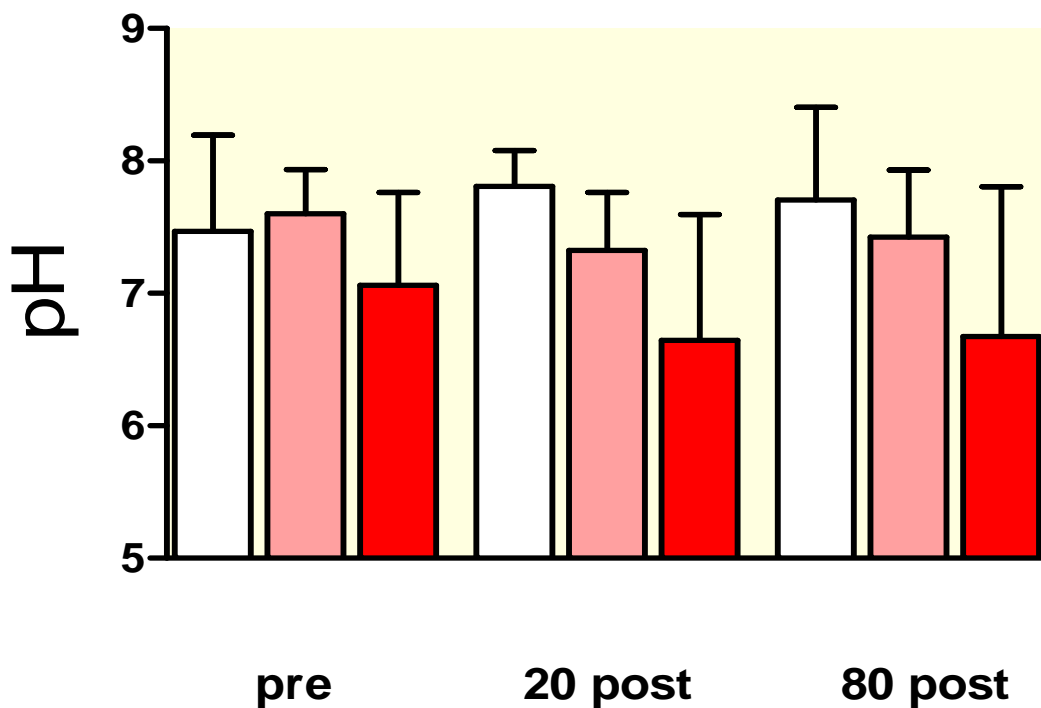


Gráfico 3. pH en EBC en corredores de 10 (blanco, n=18), 21 (rosa, n=8) y 42 (rojo, n=16) kilómetros. El número de individuos se indica debajo de las barras del valor pre. Los valores son expresados como media \pm DE.

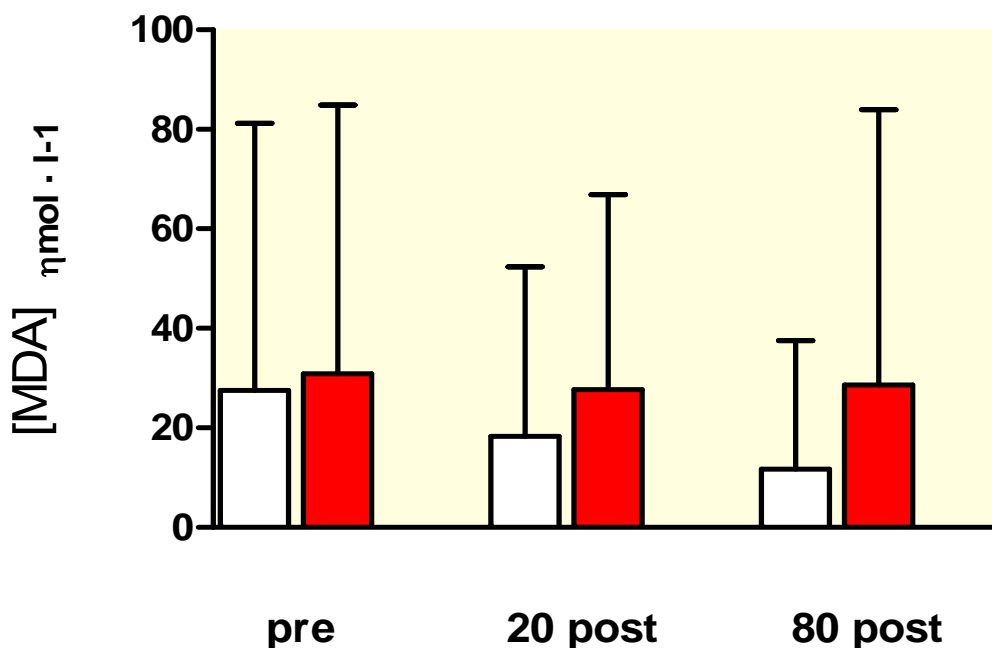


Gráfico 4. [MDA] en EBC en corredores de 10 (blanco, n=9) y 42 (rojo, n=11) kilómetros. Los valores son expresados como media \pm DE.

El promedio de los cambios absolutos de $[H_2O_2]$ mostró valores mayores para 42K versus 10K ($p < 0.001$) como se muestra en el gráfico 5. Similar fue el hallazgo para la $[NO_2^-]$ donde se observa un mayor valor para 42K versus 10K ($p < 0.05$) como se muestra en el gráfico 6. El promedio de los cambios absolutos de pH fue mayor en 10K respecto de 21K ($p < 0.05$) y 42K ($p < 0.05$) como se observa en el gráfico 7.

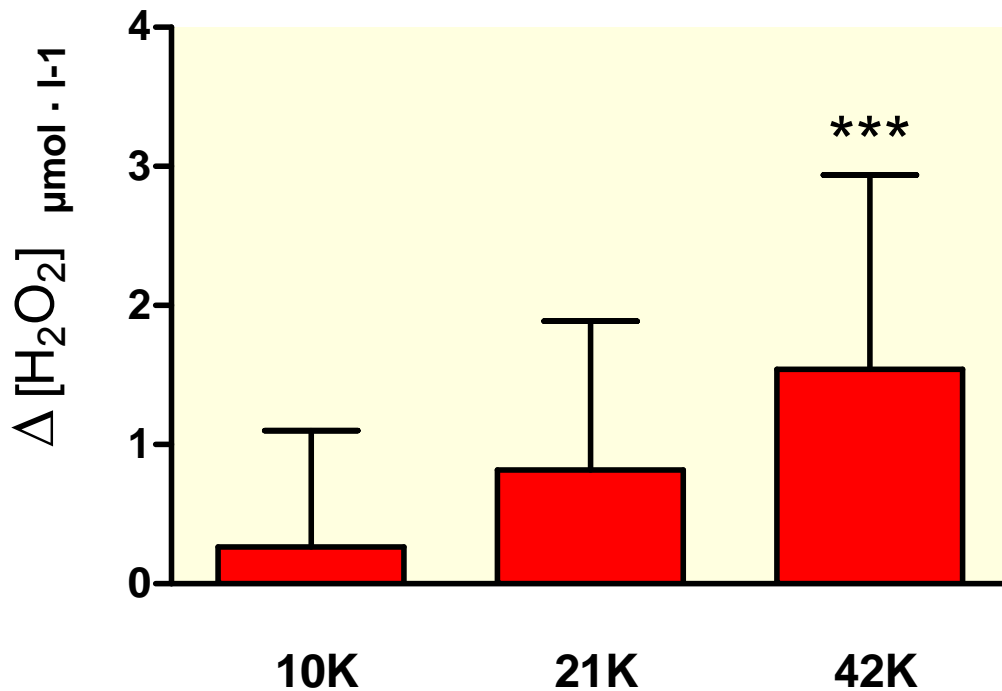


Gráfico 5. Cambios absolutos (20 post-pre) de $[H_2O_2]$ en EBC en corredores de 10 (n=18), 21 (n=12) y 42 (n=17) kilómetros. Los valores son expresados como media \pm DE, *** $p < 0.01$ diferente de 10K.

El promedio de $\Delta [H_2O_2]$ mostró una correlación directa con los $\Delta [NO_2^-]$, ($r = 0.78$, $n = 44$, $p < 0.0001$) al analizar el tramo 20 post menos-pre, como se observa en el gráfico 8. El tiempo total de la carrera de los tres grupos mostró correlaciones significativas con $\Delta [H_2O_2]$ ($r = 0.50$, $n = 47$, $p < 0.001$), $\Delta [NO_2^-]$ ($r = 0.38$, $n = 44$, $p = 0.01$) y ΔpH ($r = -0.39$, $n = 36$, $p = 0.02$). Los deltas fueron obtenidos a partir del 20 post-pre (gráficos 9, 10 y 11 respectivamente).

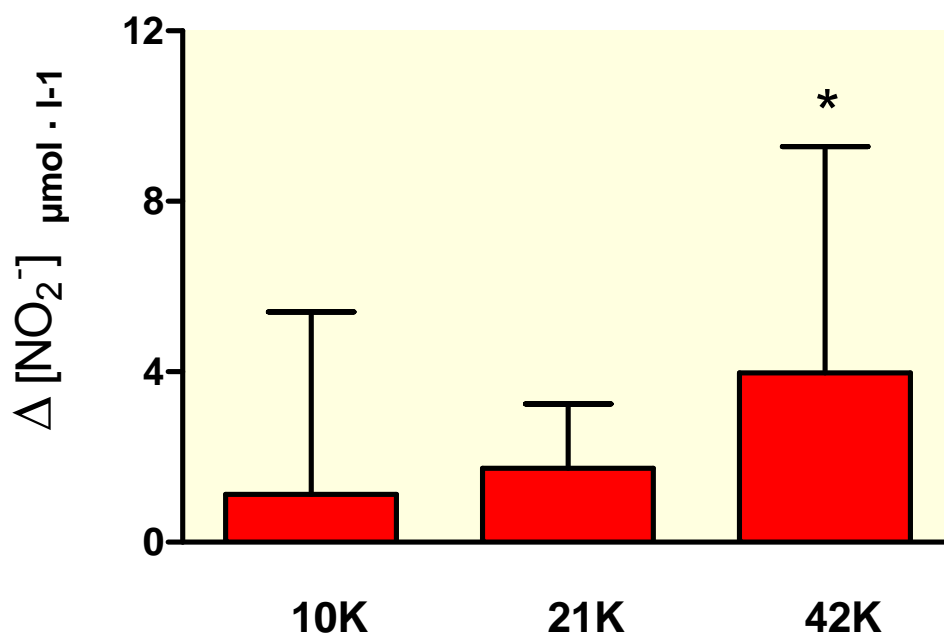


Gráfico 6. Cambios absolutos (20 post-pre) de $[NO_2^-]$ en EBC en corredores de 10 (n=18), 21 (n=10) y 42 (n=16) kilómetros. Los valores son expresados como media \pm DE, * $p < 0.05$ diferente de 10K.

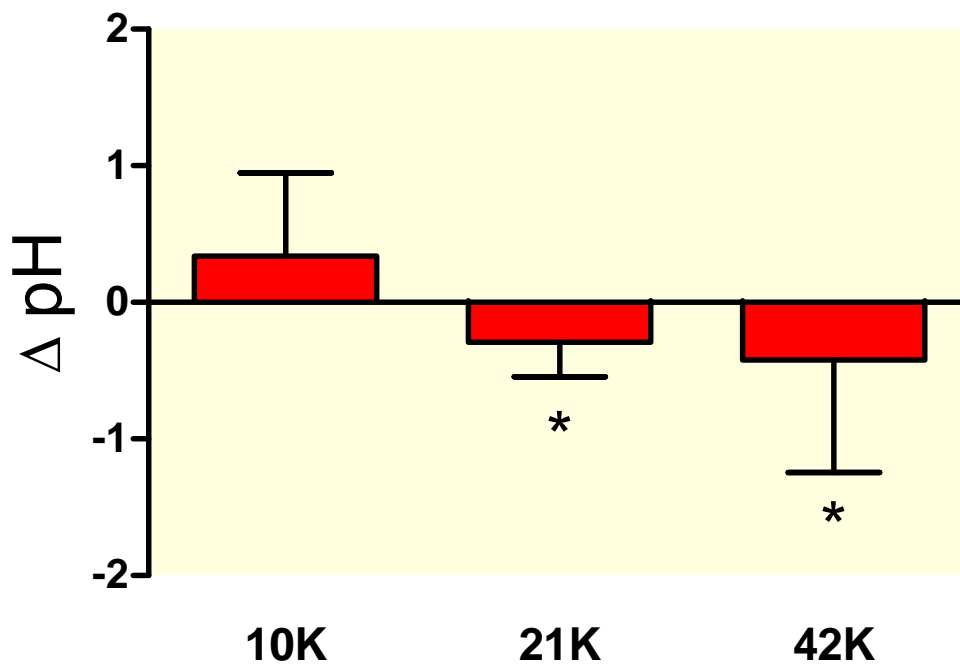


Gráfico 7. Cambios absolutos (20 post-pre) de pH en EBC en corredores de 10 (n=12), 21 (n=8) y 42 (n=16) kilómetros. Los valores son expresados como media \pm DE, * $p < 0.05$ diferente de 10K.

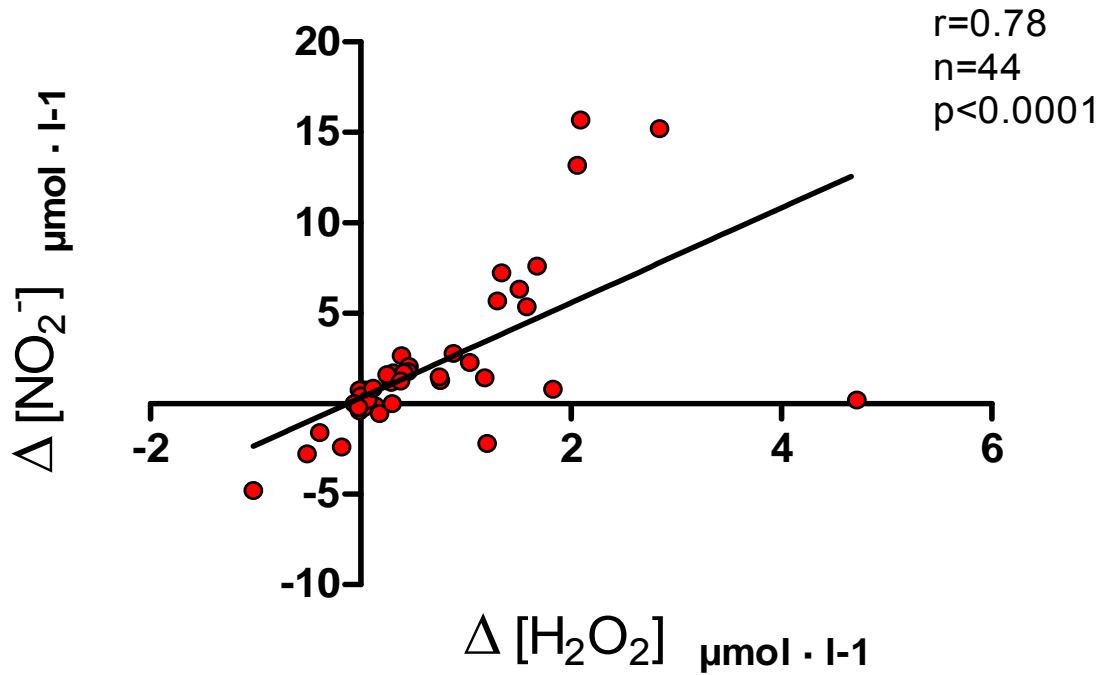


Gráfico 8. Relación entre los cambios absolutos (20 post-pre) de $[H_2O_2]$ versus los cambios absolutos (20 post-pre) $[NO_2^-]$ en corredores de 10, 21 y 42 kilómetros.

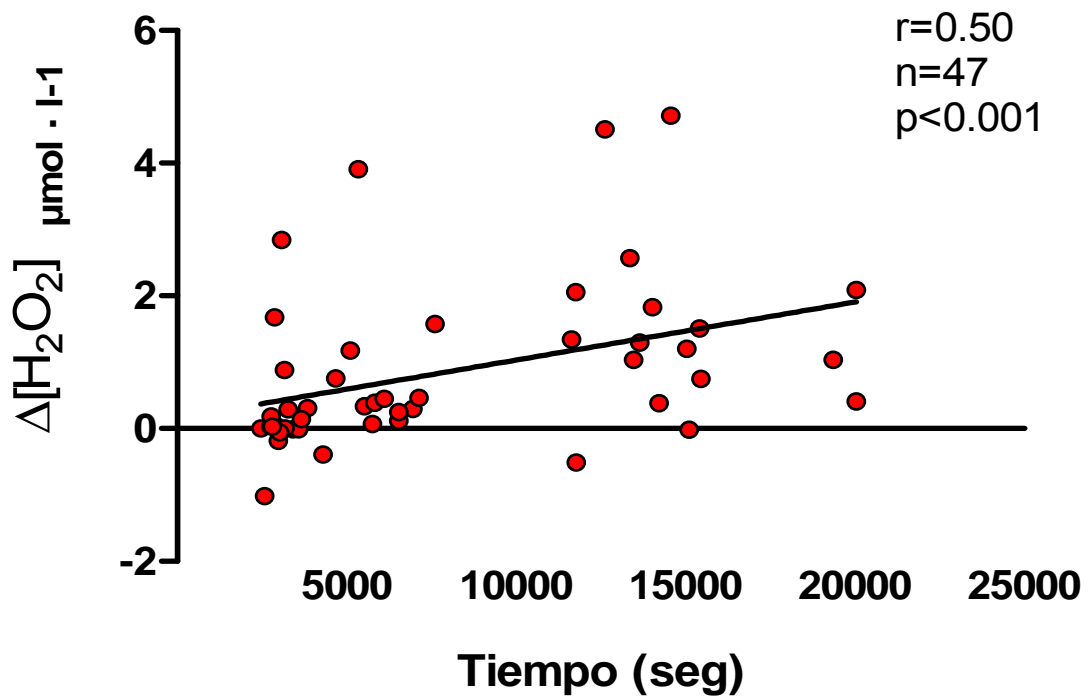


Gráfico 9. Relación entre los cambios absolutos (20 post-pre) de $[NO_2^-]$ en EBC versus el tiempo total de carrera en corredores de 10, 21 y 42 kilómetros.

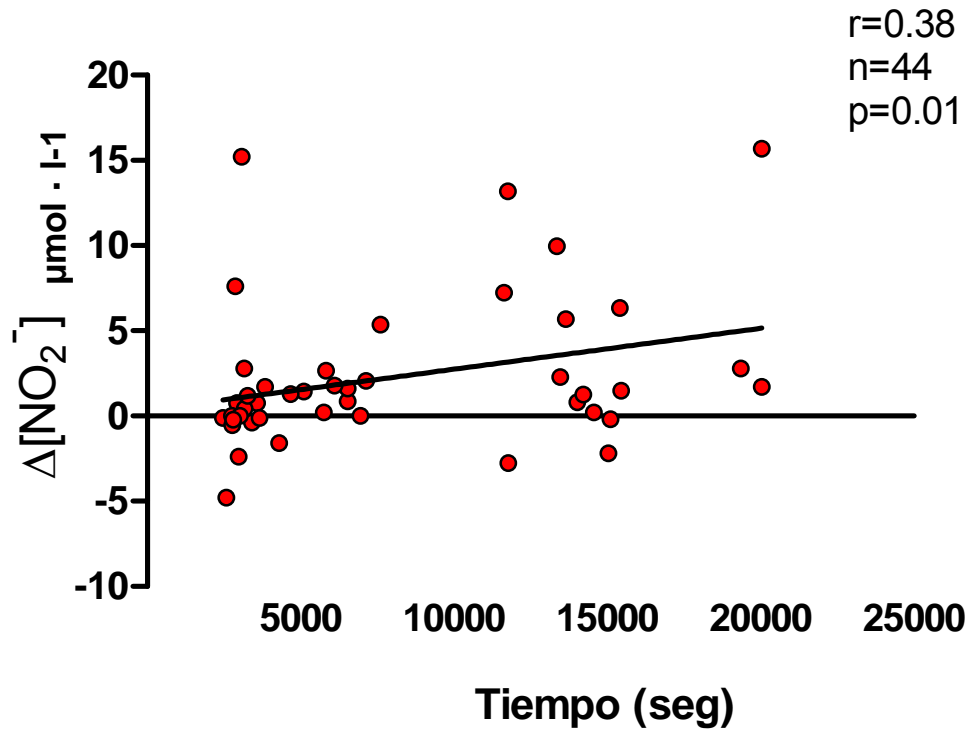


Gráfico 10. Relación entre los cambios absolutos (20 post-pre) de $[\text{NO}_2^-]$ en EBC versus el tiempo total de carrera en corredores de 10, 21 y 42 kilómetros.

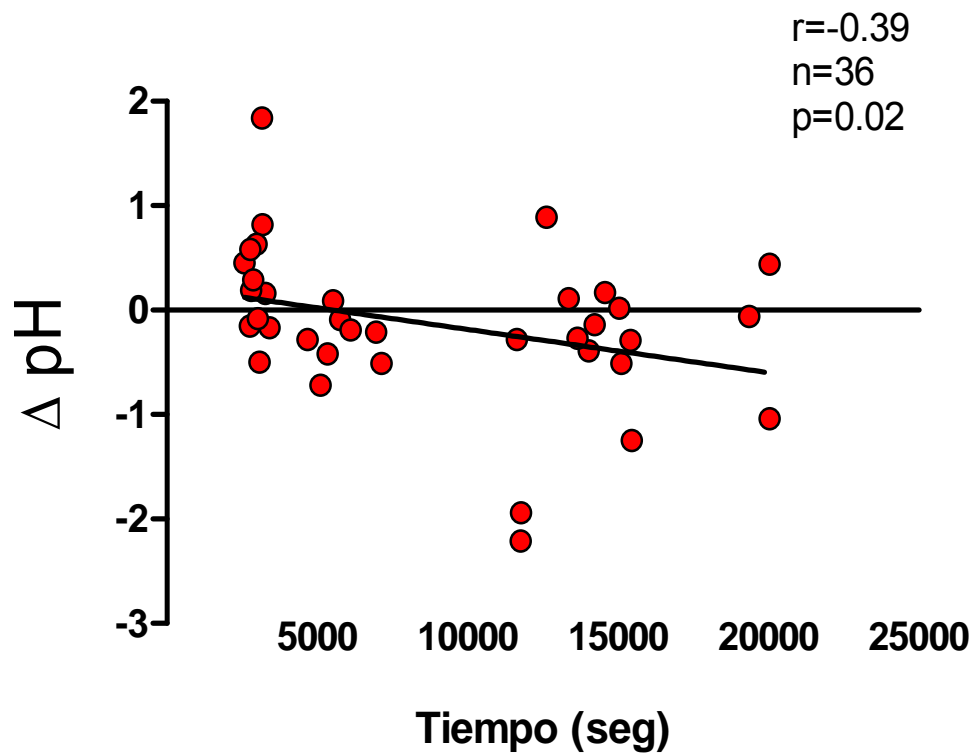


Gráfico 11. Relación entre los cambios absolutos (20 post-pre) de pH en EBC versus el tiempo total de carrera en corredores de 10, 21 y 42 kilómetros.

Los valores absolutos de todos los sujetos mostraron una correlación significativa entre $[H_2O_2]$ versus $[NO_2^-]$ ($r=0.76$, $n=132$, $p< 0.0001$). Se encontró una correlación significativa entre $[H_2O_2]$ versus pH ($r=-0.45$, $n=108$, $p< 0.0001$) y entre $[NO_2^-]$ versus pH ($r=-0.42$, $n=99$, $p< 0.0001$) como se observa en los gráficos 12, 13 y 14 respectivamente.

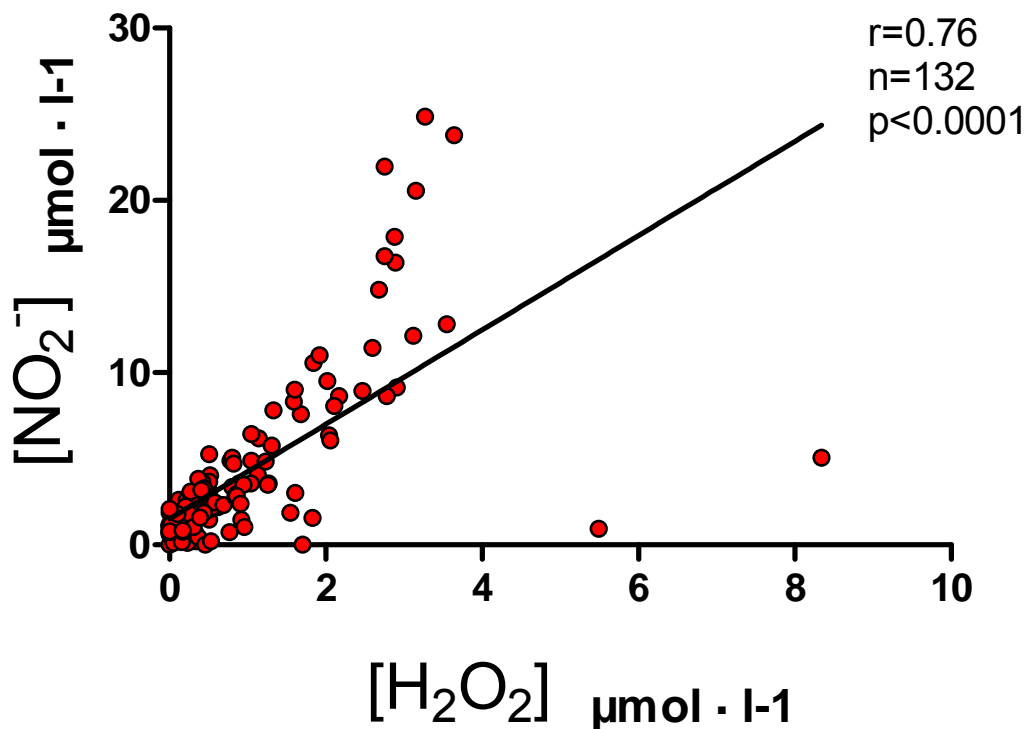


Gráfico 12. Relación entre $[H_2O_2]$ y $[NO_2^-]$ en EBC en corredores de 10, 21 y 42 kilómetros.

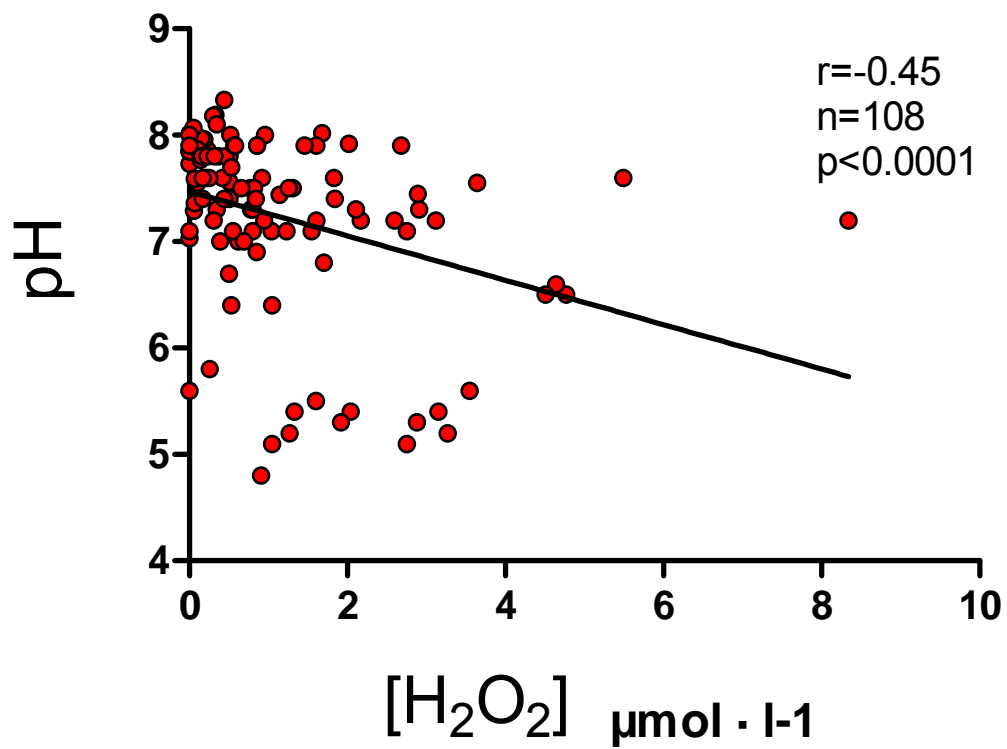


Gráfico 13. Relación entre $[H_2O_2]$ y pH en EBC en corredores de 10, 21 y 42 kilómetros.

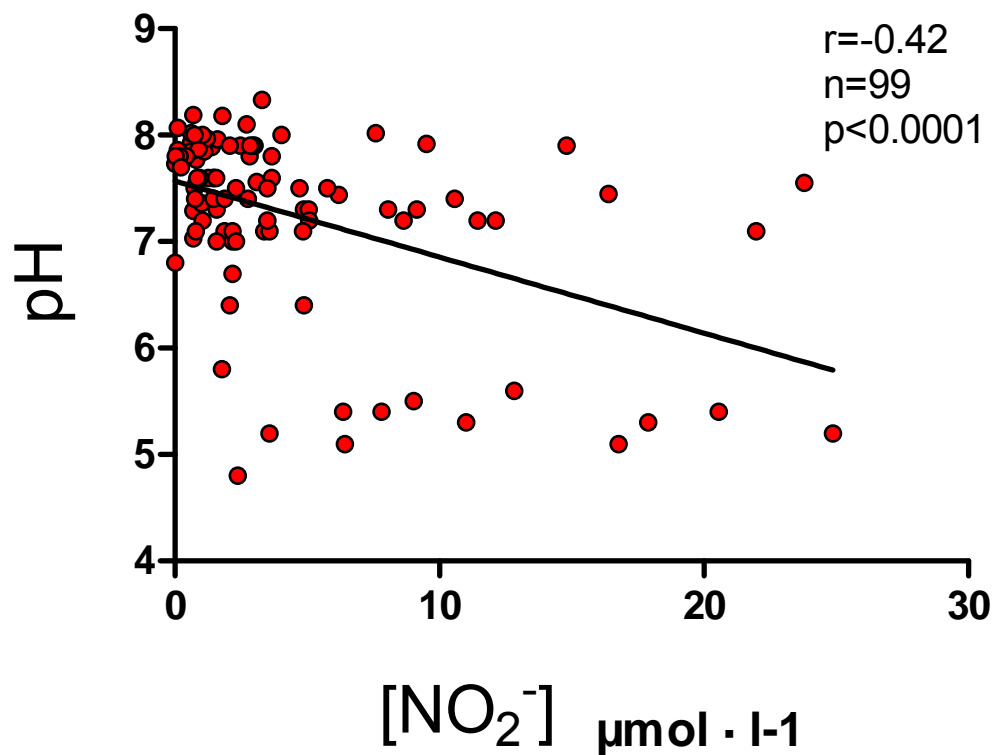


Gráfico 14. Relación entre $[NO_2^-]$ y pH en EBC en corredores de 10, 21 y 42 kilómetros.

Utilizando datos obtenidos en la misma distancia pero de diferentes carreras, se compararon dos subgrupos de corredores de 10 kilómetros y tres de 42 kilómetros respectivamente. En ambas distancias no se observaron diferencias para los tiempos de carrera, valores absolutos y cambios absolutos de $[H_2O_2]$, $[NO_2^-]$ y pH, como se observa en las tablas 4, 5 y 6 respectivamente.

En los participantes de carreras de 42K se compararon hombres versus mujeres. No se encontraron diferencias en el tiempo de carrera, en los valores absolutos, ni en los cambios para $[H_2O_2]$, $[NO_2^-]$ y pH, como se observa en las tablas 7 y 8 respectivamente.

Tabla 4. Tiempos de carrera, concentración y cambios absolutos de H_2O_2 y NO_2^- en EBC en dos carreras de 10K.

	n	Tiempo de carrera (segundos)	$[H_2O_2]$ ($\mu\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$)	$\Delta[H_2O_2]$ ($\mu\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$)	$[NO_2^-]$ ($\mu\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$)	$\Delta[NO_2^-]$ ($\mu\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$)
Carrera 6	11	2997±297	0.19±0.34	0.36±1.03	1.38±1.79	1.48±5.43
Carrera 3	5	3241±550	0.12±0.22	0.07±0.14	1.73±1.29	0.55±0.82
Valor de p		0.36	0.49	0.73	0.09	0.57

Los cambios de los valores absolutos fueron calculados a partir de los valores de 20min-pre. El análisis para pH en EBC no fue posible realizarlo por muestra insuficiente. Los valores se expresan como media±DE

Tabla 5. Tiempos de carrera, concentración de H₂O₂, NO₂⁻ y pH en EBC en tres carreras de 42K.

	n	Tiempo de carrera (segundos)	[H ₂ O ₂] (μmol · l ⁻¹)	[NO ₂ ⁻] (μmol · l ⁻¹)	pH
Carrera 2	4	14056±1045	0.32±0.38	1.22±0.83	6.95±1.04
Carrera 4	5	15046±4558	0.82±0.67	4.54±3.82	6.90±0.76
Carrera 5	8	15004±1958	0.54±0.42	2.43±1.51	7.24±0.47
Valor p		0.68	0.30	0.13	0.80

En la carrera 2 los valores NO₂⁻ fueron analizados con un n=3. En la carrera 5 los valores de pH fueron analizados con un n=7. Los valores se expresan como media±DE.

Tabla 6. Cambios absolutos de la concentración de H₂O₂, NO₂⁻ y pH en EBC en tres carreras de 42K.

	n	Δ[H ₂ O ₂] (μmol · l ⁻¹)	Δ[NO ₂ ⁻] (μmol · l ⁻¹)	Δ pH
Carrera 2	4	3.07±1.81	-0.38±1.59	0.17±0.53
Carrera 4	5	1.08±1.12	7.012±7.69	1.00±1.11
Carrera 5	8	1.07±0.78	3.64±3.29	-0.34±0.44
Valor p		0.14	0.13	0.17

Los cambios de los valores absolutos fueron calculados a partir de los valores de 20min-pre. En la carrera 2 los valores NO₂⁻ fueron analizados con un n=3. En la carrera 5 los valores de pH fueron analizados con un n=7. Los valores se expresan como media±DE.

Tabla 7. Tiempos de carrera, concentración de H₂O₂, NO₂⁻ y pH en EBC de hombres y mujeres competidores de 42K.

	n	Tiempo de carrera (segundos)	[H ₂ O ₂] (μmol · l ⁻¹)	[NO ₂ ⁻] (μmol · l ⁻¹)	pH
Hombres	12	14088±2314	0.60±0.56	3.11±2.95	7.16±0.79
Mujeres	5	16486±3036	0.48±0.38	2.19±1.62	6.84±0.40
Valor p		0.14	0.87	0.86	0.11

En los hombres, los valores absolutos para NO₂⁻ y pH fueron analizados con un n=11. Los valores se expresan como media±DE.

Tabla 8. Cambios absolutos de la concentración de H₂O₂, NO₂⁻ y pH en EBC de hombres y mujeres competidores de 42K.

	n	Δ[H ₂ O ₂] (μmol · l ⁻¹)	Δ[NO ₂ ⁻] (μmol · l ⁻¹)	Δ pH
Hombres	12	1.16±1.58	2.94±4.72	-0.39±0.926
Mujeres	5	1.36±0.92	6.23±6.36	-0.47±0.62
Valor p		0.92	0.26	0.90

Los cambios de los valores absolutos fueron calculados a partir de los valores de 20min-pre. En los hombres, los deltas para NO₂⁻ y pH fueron analizados con un n=11. Los valores se expresan como media±DE.

5. DISCUSIÓN

La participación de humanos en carreras de resistencia altera los niveles de antioxidantes plasmáticos no enzimáticos (Briviba et al., 2005), la actividad de enzimas antioxidantes intracelulares (Machefer et al., 2004) y genera daño oxidativo a lípidos (Child et al., 1998), proteínas (Guidi et al., 2010) y al ADN (Neubauer et al., 2008). Estos datos han sido obtenidos mediante el análisis tanto de indicadores sistémicos (plasma y orina), así como del estudio de linfocitos, eritrocitos y músculo esquelético (Powers y Jackson, 2008). En este trabajo nos hemos centrado en el potencial daño oxidativo pulmonar inducido por ejercicio intenso prolongado. Nuestros hallazgos son un aumento de dos importantes pro-oxidantes: H_2O_2 y NO_2^- (gráficos 1 y 2) sin variaciones del daño oxidativo a lípidos (gráfico 4).

La $[H_2O_2]$ en EBC mostró incrementos en 21K y 42K, sin variaciones para 10K (gráfico 1). Este biomarcador ha sido previamente analizado en ejercicio, sin embargo, en condiciones poco homologables, en cuanto a tiempo e intensidad del ejercicio respecto a nuestro protocolo. Nowak et al., 2001 en un ejercicio submáximo en cicloergómetro (120Wx 6 minutos) no encontraron diferencias al comparar antes y después del ejercicio. El mismo resultado se encontró tras un ejercicio máximo breve (3 minutos) en ciclistas de elite a 670 y 2160 metros de altura (Araneda et al., 2005). Midiendo $[H_2O_2]$ durante el ejercicio, Marek et al., 2008 y Marek, 2009. en un protocolo submáximo en cicloergómetro (6 minutos aprox. a 60 watt + 5 min a 120 Watt) y posteriormente en ejercicio máximo (300 W) no encontraron diferencias. Mercken et al., 2005 tampoco encontraron diferencias en un ejercicio máximo en cicloergómetro (12 minutos aprox.) en personas sanas, pero sí, en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, patología caracterizada por poseer un desbalance oxidativo pulmonar (Lee y Thomas, 2009). Los protocolos descritos comparten que fueron realizados por períodos breves de tiempo, esto contrasta y probablemente explica, en parte, las diferencias a lo encontrado en el presente estudio, donde el promedio de los $\Delta[H_2O_2]$ tienen la tendencia a incrementar según la duración de la prueba, siendo diferente los 10K versus los 42K (gráfico 5). Además esto se comprueba con la correlación moderada ($r=0.50$) entre los $\Delta[H_2O_2]$ y el tiempo de la prueba (gráfico 9).

La $[\text{NO}_2^-]$ en EBC es considerado un importante marcador de daño oxidativo e inflamación crónica de la vía aérea en pacientes con fibrosis quística y asmáticos (Formanek et al., 2002), así como en daño oxidativo e inflamación, en pacientes con daño pulmonar agudo (Gessner et al., 2003). Según nuestra investigaciones bibliográficas, la $[\text{NO}_2^-]$ no ha sido previamente determinada en EBC en condiciones similares a las reportadas en este trabajo. A pesar que metabolismo y relaciones entre el NO_2^- y el NO (su fuente de origen) corresponde a un problema complejo y aun si resolver (Bryan, 2006), el incremento del NO exhalado observado post maratón (Bonsignore et al., 2001), hace pensar que esta puede ser una de las fuentes del aumento de la $[\text{NO}_2^-]$ en EBC aquí descrita. Esta hipótesis deberá ser probada en futuras investigaciones, ya que en algunas situaciones patológicas (fibrosis quística) se han reportado aumentos $[\text{NO}_2^-]$, mientras existe NO exhalado normal (Ho et al., 1998).

La misma tendencia general observada para la $[\text{H}_2\text{O}_2]$ fue encontrada para la $[\text{NO}_2^-]$, tanto en el promedio de los valores individuales (gráfico 2), en el promedio de los cambios absolutos (gráfico 6) y en su correlación débil a moderada ($r=0.38$) con el tiempo de carrera (gráfico 10). Sumado a lo anterior, el promedio del $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ correlacionó en forma directa con el promedio del $\Delta[\text{NO}_2^-]$ (gráfico 8). Una potencial explicación a este fenómeno sea el probable origen común de ambas especies o que estas formen parte de un proceso común. La $[\text{H}_2\text{O}_2]$ en EBC correlaciona con la actividad de fagocitos en sangre periférica (Szkudlarek et al., 2003) y con los leucocitos en esputo inducido de pacientes con bronquiectasias (Loukides et al., 2002). En las carreras de larga distancia se describen aumentos del número de leucocitos en sangre, además de su mayor capacidad de formar pro-oxidantes (Briviba et al., 2005; Hessel et al., 2000). En muestras de esputo inducido, Bonsignore et al., 2001 reportaron incremento de polimorfonucleares neutrófilos post maratón.

A diferencia de lo esperado, el incremento de los pro-oxidantes no se tradujo en mayor lipidoperoxidación post ejercicio en EBC (gráfico 4). En la misma dirección, Nowak et al., 2001 no evidenciaron diferencias en TBARs en EBC en cicloergómetro (120W durante 6 minutos). Font-Ribera et al., 2010 no han reportado cambios en la

concentración de 8-isoprostanos tras 40 minutos nadando en una piscina. En condiciones de hipoxia hipobárica, aumentó la lipídoperoxidación; la [MDA] en EBC aumentó en escaladores sobre 6000 metros. Tuvo la misma variación un grupo de ciclistas en cicloergómetro a 2160 metros, mientras el mismo protocolo no generó cambios a 670 metros (Araneda et al., 2005). Heinicke et al., 2009 reportaron aumentos de 8-isoprostanos en EBC en biatletas que entrenaban en altura. De los datos aportados en el presente trabajo es posible concluir que per se el ejercicio prolongado en forma aguda no es suficiente para generar daño oxidativo en las condiciones descritas. Probablemente el ejercicio regular también induzca defensas antioxidantes que evitan el daño oxidativo agudo, como se ha reportado con anterioridad (Gómez-Cabrera et al., 2008; Boveris y Navarro, 2008). Debido al número reducido de muestras, estos resultados deberán ser comprobados posteriormente.

El pH en EBC corresponde a un parámetro estudiado en múltiples patologías. Un valor bajo de este parámetro consistentemente ha sido encontrado en procesos inflamatorios de la vía aérea y el parénquima pulmonar (Hunt J, 2007). El estudio del esputo inducido, en corredores de fondo arrojó que el entrenamiento de un año genera un proceso inflamatorio persistente sin aparente repercusión clínica, con aumento de células inflamatorias y de concentración de mediadores de la inflamación (interleuquina-8, leucotrienos E₄ e histamina) (Denguezli M et al., 1998). En un ejercicio máximo agudo se encontraron aumentos de prostaglandina E₂ y tromboxano B₂ en EBC al comparar antes y después del ejercicio (Pucsok et al., 2007). Chimenti et al., 2010 reportaron aumento de interleuquina 8, del número de células epiteliales y su apoptosis en esputo inducido, además de aumento de las proteínas derivadas de las células claras CC-16 en suero, estos resultados fueron interpretados como inflamación y daño epitelial a la vía aérea posterior a una carrera de 21K.

En el presente trabajo encontramos una tendencia a menores valores de pH al comparar entre los valores pre ejercicio (gráfico 1), probablemente esto se explica en la mayor cantidad de kilómetros por semana de los participantes de 42K respecto del grupo de 10K. Este resultado deberá ser estudiado nuevamente con un mayor número de corredores por categoría. Los promedios de Δ pH presentaron una

disminución para los grupos de 21K y 42K (gráfico 7), mientras este parámetro aumentó en el grupo de 10K. En estudios previos Marek et al., 2009 no encontraron variaciones del pH en EBC en un ejercicio máximo breve. Riediker y Danuser, 2010 reportaron el aumento del pH post ejercicio (30 minutos a 60% Fc máxima). Greenwald et al., 2009 en un estudio de campo, no evidenciaron diferencias post ejercicio agudo, mientras los valores de pH de corredores habituales eran inferiores a los controles (Ferdinands et al., 2008). Probablemente los resultados de estos estudios se puedan comparar con el grupo de 10K, sin embargo, nuevamente la realización de ejercicio intenso y más prolongado favorece una caída del pH relacionada de forma débil a moderada ($r=-0.39$) con la duración de la carrera (gráfico 7). Este resultado es similar y complementario a lo encontrado respecto a las correlaciones del tiempo de carrera con $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ y $\Delta[\text{NO}_2^-]$. En este aspecto, todas las correlaciones fueron significativas, aunque con coeficientes de correlación con valores entre débil a moderado. A pesar de esto, que el tiempo de carrera se correlacione con los tres parámetros refuerza la coherencia biológica de este hallazgo y probablemente ha influenciado en estos datos, que las muestras fueron tomadas en diferentes condiciones ambientales, en distintos recorridos (y probablemente intensidades de carrera) y con concentraciones de contaminantes distintas (tabla 2) que eventualmente pueden influir en los resultados. En experimentos posteriores será de mucha importancia realizar un control de estas variables (condiciones de laboratorio) para avanzar en dilucidar los mecanismos del fenómeno aquí descrito.

Las correlaciones inversas encontradas entre el pH y los pro-oxidantes analizados sugieren que la mayor generación de estas especies a nivel pulmonar, en estas condiciones, esta involucrado en el proceso inflamatorio y posterior caída del pH que hemos observado en este estudio (gráficos 13 y 14). Similares correlaciones han sido descritas en pacientes asmáticos, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquiectasias, todas patologías que comparten un proceso inflamatorio crónico de su vía aérea (Kostikas et al., 2002).

Existen reportes previos no concluyentes que sugieren la potencial intervención del sexo de los participantes sobre los parámetros de daño oxidativo posterior al ejercicio. Al respecto, Pepe et al., 2009 no encontraron diferencias en los cambios

por ejercicio en sujetos jóvenes que participaron en carreras de 800, 1500 y 3000 metros. En un protocolo de daño oxidativo inducido por contracciones excéntricas no se encontraron diferencias por sexo (Kerksick et al., 2008). En linfocitos, Sureda et al., 2008, encontraron una mayor actividad basal de la superóxido dismutasa mitocondrial en mujeres, además de un mayor cambio en la expresión genética y actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial en los hombres posterior a una prueba de natación al 75% de su capacidad de trabajo. En vista que la muestra analizada, en todas las distancias, contó con la presencia de corredores de ambos sexos y ante la posibilidad de que este factor hubiera podido influir en nuestros resultados, se compararon los valores basales, tiempos de carrera y cambios absolutos de los diecisiete corredores de 42K. Los resultados se resumen en las tablas 7 y 8. Los subgrupos divididos por sexo fueron comparables en cuanto a la duración de la prueba y los valores de los parámetros pre-carrera analizados en EBC. Además no se observaron diferencias en los cambios absolutos, entre hombres y mujeres, producto de la carrera. De lo anterior podemos concluir que en las condiciones experimentales planteadas los resultados no se vieron influenciados por esta diversidad de la muestra. En todo caso este resultado debe ser re-evaluado en un grupo mayor de sujetos y con un protocolo en condiciones controladas de laboratorio.

Una potencial limitación de este trabajo corresponde a las diferentes condiciones climáticas y concentración de contaminantes del aire en que se obtuvieron las muestras (tabla 2). Con objeto de evaluar la influencia de este factor en nuestros resultados, comparamos participantes de la misma distancia, en distintas carreras. En participantes de 10K (85% de la muestra total) de las carreras 3 y 6 (tabla 4) se encontraron similares tiempos de carrera y valores pre, además no se observó diferencias entre los $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ y $\Delta[\text{NO}_2^-]$, esto último, a pesar de que en la carrera 6 existía tres veces más O_3 respecto de la carrera 3, mientras que en esta última, había doce veces más MP_{10} y ocho veces más NO_2 (tabla 2). Datos obtenidos en competidores 42K (100% de la muestra), en las carreras 2, 4 y 5 tampoco mostraron diferencias en los tiempos de carrera y valores pre (tabla 5). Tampoco en los cambios absolutos de $[\text{H}_2\text{O}_2]$, $[\text{NO}_2^-]$ y el pH en EBC (tabla 6), esto a pesar que las carreras 2 y 4 (similares entre ellas) poseían niveles tres veces mayores de O_3 respecto a la carrera 5, mientras esta poseía 1.5 veces mayor

concentración de MP_{10} . Esta comparación no fue hecha para 21K por el bajo número de sujetos en una misma carrera, sin embargo especulamos que los resultados deberían ser similares. En la misma dirección de estos hallazgos, Ferdinands et al., 2008 no encontraron cambios de pH por ejercicio a diferentes concentraciones de contaminantes del aire, ni correlaciones con estos. En las dos distancias analizadas es posible concluir que probablemente los efectos de las modificaciones descritas en el EBC estén principalmente explicados por el ejercicio realizado más que por las condiciones climáticas.

6. CONCLUSIONES

Expuesto los resultados y discutidos los mismos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. En participantes de carreras de fondo se incrementa la formación de pro-oxidantes (H_2O_2 y NO_2^-) originados a nivel pulmonar, sin que esto genere aumento de marcadores de daño oxidativo a lípidos (MDA) en muestras de EBC.
2. Es probable que el aumento de los pro-oxidantes sea la expresión de un proceso inflamatorio provocado por el ejercicio prolongado debido a la asociación de los parámetros medidos con la duración de la carrera, además en la medida que aumenta el tiempo de ejercicio se favorece la inflamación pulmonar evidenciada por una baja del pH en EBC.
3. Falta por establecer las causas de este fenómeno y si los cambios descritos son expresión de un proceso localizado o se encuentra relacionado con el daño oxidativo e inflamación sistémica propia de estas condiciones de ejercicio.
4. En nuestro protocolo experimental, desarrollado en diferentes condiciones ambientales y en la que formaron parte sujetos de ambos sexos, es posible que los resultados estén más influenciados por el ejercicio físico que por estos factores.

7. IMPLICANCIAS Y PROYECCIONES

1. Se propone el uso del análisis del aire espirado condensado como una herramienta de monitoreo no invasivo del estado redox pulmonar en corredores de fondo.
2. Por medio de esta metodología se puede evaluar en estos deportistas el efecto de fármacos inhibidores de la producción de pro-oxidantes e inflamación pulmonar.
3. Futuros trabajos deben explorar los efectos de la realización de este tipo de competencias en un ambiente que posee niveles de contaminación identificado como de riesgo para la población, a fin de programar la práctica de entrenamientos y carreras.
4. Futuros trabajos deben indagar el origen dentro del pulmón de los pro-oxidantes medidos (vía aérea o compartimiento alveolar), además de incorporar parámetros específicos de la inflamación como interleuquinas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:215-223.
2. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radic Biol Med* 2010; doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071
3. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978; 45:927-932.
4. Guidi F, Magherini F, Gamberi T, Bini L, Puglia M, Marzocchini R, Ranaldi F, Modesti PA, Gulisano M, Modesti A. Plasma protein carbonylation and physical exercise. *Mol Biosyst.* 2011 ;7(3):640-650.
5. Radak Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H , Goto S. A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. *Pflugers Arch* 1998; 435:439-441.
6. Reddy KV, Kumar TC, Prasad M, Reddanna P. Pulmonary lipid peroxidation and antioxidant defenses during exhaustive physical exercise: the role of vitamin E and selenium. *Nutrition* 1998; 14:448-451.
7. Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243:678-682.
8. Holguin F, Fitzpatrick A. Obesity, asthma, and oxidative stress. *J Appl Physiol* 2010; 108:754-759.
9. Ward PA. (2010) Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1203:53-59.
10. Sue-Chu M, Larsson L, Moen T, Rennard SI, Bjermer L. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage findings in cross-country skiers with and without "ski asthma". *Eur Respir J* 1999; 13:626-632.
11. Karjalainen EM, Laitinen A, Sue-Chu M, Altraja A, Bjermer L, Laitinen LA. Evidence of airway inflammation and remodeling in ski athletes with and without bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:2086-2091.
12. Sue-Chu M, Brannan JD, Anderson SD, Chew N, Bjermer L. Airway hyperresponsiveness to methacholine, adenosine 5-monophosphate, mannitol, eucapnic voluntary hyperpnoea and field exercise challenge in elite cross-country skiers. *Br J Sports Med* 2010; 44:827-832.
13. Pedersen L, Lund TK, Barnes PJ, Kharitonov SA, Backer V. Airway responsiveness and inflammation in adolescent elite swimmers. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:322-327

14. Bonsignore MR, Morici G, Riccobono L, Insalaco G, Bonanno A, Profita M, Paternò A, Vassalle C, Mirabella A, Vignola AM. Airway inflammation in nonasthmatic amateur runners. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:L668-676.
15. Chimenti L, Morici G, Paterno A, Santagata R, Bonanno A, Riccobono L, Bellia V, Bonsignore MR. Bronchial epithelial damage after a half-marathon in nonasthmatic amateur runners. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298:L857-862.
16. Nowak D, Kalucka S, Białasiewicz P, Król M. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 2001; 15:178-186.
17. Marek E, Mückenhoff K, Streckert HJ, Becher G, Marek W. Measurements of L-lactate and H₂O₂ in exhaled breath condensate at rest and mild to moderate exercise in young and healthy subjects. *Pneumologie* 2008; 62:541-547.
18. Font-Ribera L, Kogevinas M, Zock JP, Gómez FP, Barreiro E, Nieuwenhuijsen MJ, Fernandez P, Lourencetti C, Pérez-Olabarría M, Bustamante M, Marcos R, Grimalt JO, Villanueva CM. Short-Term Changes in Respiratory Biomarkers after Swimming in a Chlorinated Pool. *Environ Health Perspect* 2010; 118:1538-1544.
19. Araneda OF, García C, Lagos N, Quiroga G, Cajigal J, Salazar MP, Behn C. Lung oxidative stress as related to exercise and altitude. Lipid peroxidation evidence in exhaled breath condensate: a possible predictor of acute mountain sickness. *Eur J Appl Physiol* 2005; 95:383-390.
20. Heinicke I, Boehler A, Rechsteiner T, Bogdanova A, Jelkmann W, Hofer M, Rawlings P, Araneda OF, Behn C, Gassmann M, Heinicke K. Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate. *Eur J Appl Physiol* 2009; 106:599-604.
21. Halliwell B y Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (3ra edición). Oxford University Press; 1999.
22. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44-84.
23. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005; 81:268S-276S.
24. Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients *Free Radic Biol Med*. 1995; 18(6):1079-1086.
25. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Vina J. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J*. 2004; 18(13):1499-1506.

26. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008; 88:1243-1276.
27. Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 ; 44(2):142-152.
28. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol*. 1992; 73(5):1797-1804.
29. Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol*. 1992; 73(5):1805-1809.
30. O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst JC. Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol*. 1996; 81(3):1197-1206.
31. Balon TW, Nadler JL. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol*. 1994; 77(6):2519-2521.
32. Abbey EL, Rankin JW. Effect of quercetin supplementation on repeated-sprint performance, xanthine-oxidase activity, and inflammation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2011;21(2):91-6.
33. Allgrove J, Farrell E, Gleeson M, Williamson G, Cooper K. Regular dark chocolate consumption's reduction of oxidative stress and increase of free-fatty-acid mobilization in response to prolonged cycling. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2011;21(2):113-123.
34. Gül I, Gökbel H, Belviranlı M, Okudan N, Büyükbaş S, Başaralı K. Oxidative stress and antioxidant defense in plasma after repeated bouts of supramaximal exercise: the effect of coenzyme Q10. *J Sports Med Phys Fitness*. 2011;51(2):305-312.
35. McAnulty L, Nieman D, Dumke C, Shooter L, Henson D, Utter A, Milne G, McAnulty S. Effect of blueberry ingestion on natural killer cell counts, oxidative stress, and inflammation prior to and after 2.5 h of running. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 2011;10.1139/h11-120.
36. Theodorou AA, Nikolaidis MG, Paschalis V, Koutsias S, Panayiotou G, Fatouros IG, Koutedakis Y, Jamurtas AZ. No effect of antioxidant supplementation on muscle performance and blood redox status adaptations to eccentric training. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(6):1373-83.
37. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 2010; 45(7-8):466-472.
38. Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(2):224-229.

39. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*. 2005; 567(Pt 1):113-120.
40. Gómez-Cabrera MC, Pallardó FV, Sastre J, Viña J, García-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA*. 2003; 289(19):2503-2504.
41. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(2):126-131.
42. Gomez-Cabrera MC, Close GL, Kayani A, McArdle A, Viña J, Jackson MJ. Effect of xanthine oxidase-generated extracellular superoxide on skeletal muscle force generation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298(1):R2-8.
43. Babior BM, Curnutte JT, McMurrich BJ. The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J Clin Invest*. 1976; 58(4):989-996.
44. Macha M, Schlafer M, Kluger MJ. Human neutrophil hydrogen peroxide generation following physical exercise. *J Sports Med Phys Fitness*. 1990; 30(4):412-419.
45. Kakanis MW, Peake J, Brenu EW, Simmonds M, Gray B, Hooper SL, Marshall-Gradisnik SM. The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. *Exerc Immunol Rev*. 2010; 16:119-137.
46. Pattwell DM, McArdle A, Morgan JE, Patridge TA, Jackson MJ. Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(7):1064-1072.
47. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Pagliaro P. Cardioprotection: a radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787(7):781-793.
48. Breitbart GB, Dillon PK, Suval WD, Padberg FT Jr, FitzPatrick M, Durán WN. Leukopenia reduces microvascular clearance of macromolecules in ischemia-reperfusion injury. *Curr Surg*. 1990; 47(1):8-12.
49. Gao X, Zhang H, Belmadani S, Wu J, Xu X, Elford H, Potter BJ, Zhang C. Role of TNF-alpha-induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295(6):H2242-2249.
50. Rodriguez MC, Rosenfeld J, Tarnopolsky MA. Plasma malondialdehyde increases transiently after ischemic forearm exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35(11):1859-1865.

51. Groussard C, Machefer G, Rannou F, Faure H, Zouhal H, Sergent O, Chevanne M, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate test. *Can J Appl Physiol.* 2003; 28(1):79-92.
52. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2003; 89(1):14-20.
53. Shi M, Wang X, Yamanaka T, Ogita F, Nakatani K, Takeuchi T. Effects of anaerobic exercise and aerobic exercise on biomarkers of oxidative stress. *Environ Health Prev Med.* 2007; 12(5):202-208.
54. Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 282(1):78-83.
55. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc.* 1998; 30(11):1603-1607.
56. Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, Cheng H, Liu TY, Hsu CF, Kong CW. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(11):1465-1472.
57. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(9):5119-5123.
58. Machefer G, Groussard C, Rannou-Bekono F, Zouhal H, Faure H, Vincent S, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Extreme running competition decreases blood antioxidant defense capacity. *J Am Coll Nutr* 2004; 23:358-364.
59. Radák Z, Ogonovszky H, Dubecz J, Pavlik G, Sasvari M, Pucsok J, Berkes I, Csont T, Ferdinandy P. Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33(8):726-730.
60. Ashton T, Young IS, Peters JR, Jones E, Jackson SK, Davies B, Rowlands CC. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol.* 1999; 87(6):2032-2036.
61. Lawler JM, Kwak HB, Kim JH, Suk MH. Exercise training inducibility of MnSOD protein expression and activity is retained while reducing prooxidant signaling in the heart of senescent rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 296(5):R1496-502.
62. Campbell PT, Gross MD, Potter JD, Schmitz KH, Duggan C, McTiernan A, Ulrich CM. Effect of exercise on oxidative stress: a 12-month randomized, controlled trial. *Med Sci Sports Exerc.* 2010; 42(8):1448-1453.

63. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067:425-435.
64. Fisher G, Schwartz DD, Quindry J, Barberio MD, Foster EB, Jones KW, Pascoe DD. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *J Appl Physiol.* 2011 ;110(3):730-737.
65. Powers SK, Talbert EE, Adhietty PJ. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol.* 2011 ;589(9):2129-38.
66. Walters DM, Cho HY, Kleeberger SR. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(2):321-332.
67. Comhair SA y Erzurum, SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:246-255.
68. Merker MP, Pitt BR, Choi AM, Hassoun PM, Dawson CA, Fisher AB. Lung redox homeostasis: emerging concepts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: 413-417.
69. Roberts ES, Malstrom SE, Dreher KL. In situ pulmonary localization of air pollution particle-induced oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A* 2007; 70(22):1929-1935.
70. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med* 2009; 30(1-2):60-76.
71. Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey, GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:427-431.
72. Morrison D, Rahman I, MacNee W. Permeability, inflammation and oxidant status in airspace epithelium exposed to ozone. *Respir Med.* 2006; 100(12):2227-2234.
73. Yamaoka S, Kim HS, Ogihara T, Oue S, Takitani K, Yoshida Y, Tamai H. Severe Vitamin E deficiency exacerbates acute hyperoxic lung injury associated with increased oxidative stress and inflammation. *Free Radic Res* 2008; 42:602-612.
74. Stone V. Environmental air pollution. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:S44-S47.
75. Cross E, Valacchi G, Schock B, Wilson M, Weber S, Eiserich J, van der Vliet A. Environmental oxidant pollutant effects on biological systems. A focus on micronutrient antioxidant-oxidant interactions. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 154:1430-1435.
76. Ochs-Balcom HM, Grant BJ, Muti P, Sempos CT, Freudenheim JL, Browne RW, Trevisan M, Iacoviello L, Cassano PA, Schünemann HJ. Oxidative stress and pulmonary function in the general population. *Am J Epidemiol* 2005; 162:1137-1145.

77. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*. 2000; 16(3):534-554.
78. Hunt J. Exhaled breath condensate: an overview. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007; 27:587-596.
79. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ. On behalf of the ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26:523-548.
80. Kharitonov S, Barnes P. Exhaled biomarkers. *Chest* 2006; 130(5):1541-1546.
81. Rosias P, Robroeks CM, Kester A, den Hartog GJ, Wodzig WK, Rijkers GT, Zimmermann LJ, van Schayck CP, Jöbsis Q, Dompeling E. Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers. *Eur Respir J*. 2008; 31(5):934-942.
82. van Beurden WJ, Harff GA, Dekhuijzen PN, van den Bosch MJ, Creemers JP, Smeenk FW. An efficient and reproducible method for measuring hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Respir Med*. 2002; 96(3):197-203.
83. Walsh BK, Mackey DJ, Pajewski T, Yu Y, Gaston BM, Hunt JF. Exhaled-breath condensate pH can be safely and continuously monitored in mechanically ventilated patients. *Respir Care*. 2006; 51(10):1125-1131.
84. Moeller A, Franklin P, Hall GL, Horak F Jr, Wildhaber JH, Stick SM. Measuring exhaled breath condensates in infants. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41(2):184-187.
85. Horváth I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Fan Chung K, Barnes PJ. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1042-1046.
86. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Lachanis S, Panagou P, Siafakas NM. Exhaled H₂O₂ in steady-state bronchiectasis: relationship with cellular composition in induced sputum, spirometry, and extent and severity of disease. *Chest* 2002; 121:81-87.
87. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:731-737.
88. Garey KW, Neuhauser MM, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest* 2004; 125:22-26.
89. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Corradi M, van Rensen L, Geddes DM, Hodson ME, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55:205-209.

90. Montuschi P, Ciabattoni G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, Barnes PJ. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1524-1527.
91. Araneda OF, Salazar MP. Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate. *J Bras Pneumol* 2009; 35:69-72.
92. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax*. 1999; 54:1061-1069.
93. Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A, Bunyan D, Hom S, Nguyen A, Hunt JF. Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest* 2006; 129:426-430.
94. Larstad M, Ljungkvist G, Olin AC, Toren K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 766:107-114.
95. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994; 220:403-409.
96. Gay C, Gebicki JM. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Anal Biochem*. 2000; 284(2):217-220.
97. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
98. Briviba K, Watzl B, Nickel K, Kulling S, Bös K, Haertel S, Rechkemmer G, Bub A. A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. *Redox Rep* 2005; 10:325-331.
99. Guidi F, Magherini F, Gamberi T, Bini L, Puglia M, Marzocchini R, Ranaldi F, Modesti PA, Gulisano M, Modesti A. Plasma protein carbonylation and physical exercise. *Mol Biosyst* 2010; doi: 10.1039/c0mb00106f.
100. Neubauer O, Reichhold S, Nersesyan A, König D, Wagner KH. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses?. *Exerc Immunol Rev* 2008; 14:51-72.
101. Marek E, Platen P, Volke J, Mückenhoff K, Marek W. Hydrogen peroxide release and acid-base status in exhaled breath condensate at rest and after maximal exercise in young, healthy subjects. *Eur J Med Res* 2009; 14:134-139.
102. Mercken EM, Hageman GJ, Schols AM, Akkermans MA, Bast A, Wouters EF. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:994-1001.

103. Lee W, Thomas PS. Oxidative stress in COPD and its measurement through exhaled breath condensate. *Clin Transl Sci* 2009; 2:150-155.
104. Formanek W, Inci D, Lauener RP, Wildhaber JH, Frey U, Hall GL. Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease. *Eur Respir J* 2002; 19:487-491.
105. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Lange T, Engelmann L, Schauer J, Wirtz H. Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest* 2003; 124:1046-1052.
106. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med* 2006; 41:691-701.
107. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53:680-684.
108. Szkudlarek U, Maria L, Kasielski M, Kaucka S, Nowak D. Exhaled hydrogen peroxide correlates with the release of reactive oxygen species by blood phagocytes in healthy subjects. *Respir Med* 2003; 97:718-725.
109. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Lachanis S, Panagou P, Siafakas NM. Exhaled H₂O₂ in steady-state bronchiectasis: relationship with cellular composition in induced sputum, spirometry, and extent and severity of disease. *Chest* 2002; 121:81-87.
110. Hessel E, Haberland A, Müller M, Lerche D, Schimke I. Oxygen radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running?. *Clin Chim Acta* 2000; 298:145-156.
111. Denguezli M, Ben Chiekh I, Ben Saad H, Zaouali-Ajina M, Tabka Z, Abdelkrim Z. One-year endurance training: effects on lung function and airway inflammation. *J Sports Sci* 2008; 26:1351-1359.
112. Pucsok JM, Györe I, Argay K, Huszár E, Barát E, Pucsok J, Horváth I. Effect of exercise on levels of cyclo-oxygenase mediators in exhaled breath condensate in elite athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 2007; 47:223-227.
113. Riediker M, Danuser B. Exhaled breath condensate pH is increased after moderate exercise. *J Aerosol Med* 2007; 20:13-18.
114. Greenwald R, Ferdinands JM, Teague WG. Ionic determinants of exhaled breath condensate pH before and after exercise in adolescent athletes. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44:768-777.
115. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1364-1370.

116. Kerksick C, Taylor L 4th, Harvey A, Willoughby D. Gender-related differences in muscle injury, oxidative stress, and apoptosis. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40(10):1772-80.
117. Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Tur JA, Pons A. Lymphocyte antioxidant response and H₂O₂ production after a swimming session: gender differences. *Free Radic Res.* 2008;42(4):312-319.
118. Pepe H, Balci SS, Revan S, Akalin PP, Kurtoğlu F. Comparison of oxidative stress and antioxidant capacity before and after running exercises in both sexes. *Gend Med.* 2009;6(4):587-95.

9. ANEXOS

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Protocolo: Evaluación de la inflamación y el daño oxidativo pulmonar posterior a la realización de un ejercicio físico prolongado.

Investigador responsable:

Oscar Araneda Valenzuela, Médico Cirujano, RUT 12291768-1

- a) Esta investigación tiene por objetivo conocer el rol del ejercicio físico prolongado como generador potencial de fenómenos inflamatorios a nivel pulmonar.
- b) Por mi propia iniciativa participo en la prueba atlética denominada..... a desarrollarse el día..... eximiendo a los investigadores de toda responsabilidad ante eventos ocurridos durante el transcurso de la carrera propiamente tal.
- c) El grupo de investigadores le solicitará muestras de aire espirado condensado en tres oportunidades; antes de la carrera, a los 20 y a los 80 minutos una vez finalizada la prueba respectivamente. La obtención de muestras de aire espirado condensado es un procedimiento no invasivo y no existe riesgo asociado desarrollo.
- d) Los procedimientos y costos de esta investigación serán cubiertos por los investigadores, no incurriendo Ud en costo alguno durante el desarrollo del proyecto, tampoco Ud. recibirá ninguna compensación económica por su participación en este estudio.
- e) Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada con estricta confidencialidad. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.
- f) Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria, pudiendo además retirarse en cualquier momento sin ser obligado/a a dar razones. De igual manera el equipo investigador puede retirarlo de este estudio si consideran que esta decisión va en su beneficio.
- g) Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede escribir al investigados responsable a oscar.araneda@uv.cl

Firma del voluntario

Nombre Completo y Apellidos

RUT:

Lugar....., Fecha.....

ANEXO 2

ENCUESTA DE PARTICIPACIÓN

Estimado/a.....

En el contexto de una investigación científica necesitamos que completes la siguiente información:

1. Fecha de nacimiento.....
2. Año en que comenzaste a realizar running.....
3. Tu altura corporal.....
4. Tu peso actual.....
5. Cuantos kilómetros a la semana corres actualmente.....
6. Máxima distancia que has corrido y en que fecha la realizaste.....
7. Señala tus marcas y año en que las realizaste

10K.....
21K.....
42K.....
8. Prueba en que competirás en esta ecuación.....

Fecha y sitio de la carrera.....

ACTA DE EVALUACION BIOETICA

I. El Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Valparaíso constituido por: Dr. Agustín Martínez, Dr. Marco Fuenzalida, Dra. MV Claudia Delgado y M Cs. Juan Carlos Espinoza, en su sesión del 27 de septiembre del presente declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto: **“DAÑO OXIDATIVO PULMONAR INDUCIDO POR EJERCICIO AERÓBICO PROLONGADO EVALUADO A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DEL AIRE ESPIRADO CONDENSADO”**, presentado por el investigador responsable Dr. Oscar Araneda V, adscrito a esta Facultad.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los siguientes antecedentes:

MARCO TEORICO, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La realización de ejercicio físico aumenta la formación de radicales libres y en algunos casos implica daño oxidativo tisular. El aumento del superóxido y peróxido de hidrógeno de origen mitocondrial, la activación de fagocitos y el incremento de la actividad de la xantina oxidasa constituyen los mecanismos primarios que lo sustentan. El daño oxidativo asociado al ejercicio a sido estudiado en varios aspectos, describiéndose tanto como fenómeno sistémico y órgano específico. En este aspecto, destaca particularmente el estudio a nivel del músculo esquelético, mientras otros órganos han sido solo parcialmente abordados. A nivel del tejido pulmonar se ha logrado caracterizar el daño oxidativo inducido por ejercicio utilizando mayoritariamente modelos animales, debido a las dificultades técnicas y la invasividad de los métodos requeridos para la realización de estos estudios en humanos. El análisis del aire espirado condensado, en los últimos años, ha sido aplicado en las más variadas situaciones fisiológicas y patológicas pulmonares, estableciéndose indicadores de inflamación y daño oxidativo a este órgano, sin embargo, ha sido poco utilizado para estudiar el efecto del ejercicio. Previamente se ha abordado la generación de daño oxidativo durante el ejercicio, encontrándose aumentos de la concentración de pro-oxidantes y aumento del daño oxidativo a lípidos en escaladores de un volcán de 6125 metros y durante un ejercicio en cicloergómetro a 2160 metros. Similares resultados fueron reportados en sujetos que entrenaban a 2800 metros. Una variedad de ejercicio conocida por favorecer el aumento de los pro-oxidantes y la generación de daño oxidativo son las carreras de fondo atlético, sin embargo, el efecto de este tipo de actividad física sobre el tejido pulmonar no ha sido

previamente evaluado a través del análisis del aire espirado condensado lo que se pretende caracterizar a través de la realización de este trabajo.

HIPOTESIS

La participación en las carreras de fondo atlético de alta intensidad y prolongadas aumenta la generación de pro-oxidantes y favorece el daño oxidativo pulmonar.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el estado redox pulmonar, a través del análisis de muestras de aire espirado condensado en sujetos que realizan ejercicio aeróbico prolongado.

ESPECIFICOS

1.-Analizar la concentración de marcadores de pro-oxidantes y daño oxidativo en humanos que participan en carreras de fondo atlético (10, 21 y 42 kilómetros).

2.-Determinar el efecto de la distancia recorrida sobre la generación de pro-oxidantes y daño oxidativo en humanos que participan en carreras de fondo atlético (10, 21 y 42 kilómetros).

MATERIALES Y METODOS

Se conducirá un estudio transversal del tipo experimental que requiere la captación de corredores de fondo atlético aficionados de ambos sexos que participen carreras de 10, 21 y 42 kilómetros, teniendo como objetivo al menos tener 8 atletas por cada distancia para poder compararlas entre sí. Los atletas deberán cumplir con los criterios de estar sanos al momento de la prueba, no ser fumadores, ni consumidores de fármacos ni suplementos antioxidantes y deberán responder una encuesta sobre estado de salud y una descripción de la cantidad de ejercicio que realizan a la semana. Los que cumplan con los criterios descritos serán enrolados en el siguiente protocolo:

1.-Evaluaciones fisiológicas básicas de los atletas: peso, talla y espirometría.

2.-Toma de muestras de aire espirado en las carreras de fondo: Se procederá a tomar muestras de aire espirado condensado utilizando el dispositivo diseñado y validado

previamente por el investigador principal. Las muestras serán tomadas antes y hasta dos horas posteriores a la carrera en sus diversas distancias, para ser almacenadas en tanque de nitrógeno y posteriormente en -80 grados Celsius. Esta muestra se obtiene a través de la respiración en reposo del sujeto (en promedio por 15 minutos) a través de un sistema de válvulas de una vía y tubos de vidrio que pasan por un sistema enfriante, corresponde a un sistema no invasivo. *(En anexos papers de trabajos previos del investigador principal con esta metodología).*

3.-Análisis químico del aire espirado condensado: contempla las determinaciones de la concentración de peróxido de hidrógeno según Gay, nitritos utilizando la reacción de Griess como indicadores de pro-oxidantes. La concentración de malondialdehído será determinada según la técnica de Larstad como indicador de lipoperoxidación y pH como indicador de inflamación pulmonar.

JUSTIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA Y RELEVANCIA DEL PROYECTO

La presente investigación pretende aportar una nueva evidencia de formación de pro-oxidantes y daño oxidativo pulmonar post-ejercicio en humanos que se exponen a sesiones prolongadas de carreras pedestres a través del análisis del aire espirado condensado. Esto permitirá aproximarse a la comprensión de las modificaciones del estado redox pulmonar como respuesta al ejercicio físico de larga duración. Este método puede convertirse en una forma de monitoreo no invasivo a realizar en corredores habituales de larga distancia y además una forma de evaluar a posteriori el efecto de la acción de fármacos que inhiban los potenciales daños en estas condiciones.



Dirección de Investigación

FACULTAD DE CIENCIAS
Comité de Bioética para la
Investigación

Consentimiento Informado

Título del Protocolo: Evaluación de la inflamación y el daño oxidativo pulmonar posterior a la realización de un ejercicio físico prolongado.

Investigador responsable:

Oscar F. Araneda Valenzuela, Médico Cirujano, RUT 12291768-1

- a) Esta investigación tiene por objetivo conocer el rol del ejercicio físico prolongado como generador potencial de fenómenos inflamatorios a nivel pulmonar.
- b) Por mi propia iniciativa participo en una prueba de larga distancia en la distancia de kilómetros desarrollada el día.....
- c) Se le solicitará muestras de aire espirado condensado en tres oportunidades; antes de la carrera y en dos oportunidades una vez finalizada la prueba. La obtención de muestras de aire espirado condensado es un procedimiento no invasivo y no existe riesgo asociado desarrollo.
- d) Los procedimientos y costos de esta investigación serán cubiertos por los investigadores, no incurriendo Ud en costo alguno durante el desarrollo del proyecto, tampoco Ud. recibirá ninguna compensación económica ni en especies por su participación en este estudio.
- e) Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada con estricta confidencialidad. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.
- f) Su Participación en esta investigación es totalmente voluntaria, pudiendo además retirarse en cualquier momento sin ser obligado/a a dar razones. De igual manera el equipo investigador puede retirarlo de este estudio si consideran que esta decisión va en su beneficio.
- g) Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a Oscar F. Araneda Valenzuela, fono 3281261.

Firma del voluntario

Nombre Completo y Apellidos

Nombre Completo y Apellidos

RUT:

RUT:

Lugar....., Fecha.....



Dirección de Investigación

FACULTAD DE CIENCIAS
Comité de Bioética para la
Investigación

Por lo anterior, el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias **aprueba** el protocolo experimental.

Firma el Acta el Presidente del Comité de Bioética Institucional, en representación del Comité.

Valparaíso, 29 de Septiembre de 2011.



Juan Carlos Espinoza Ibáñez
Presidente Comité de Bioética
Facultad de Ciencias – UV

Artículo 1:

Araneda OF, Salazar MP. Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate. *J Bras Pneumol* 2009; 35:69-72.

Brief Communication

Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate*

Diseño y evaluación de un equipo para obtener aire espirado condensado

Oscar Florencio Araneda Valenzuela, María Paulina Salazar Encina

Abstract

In recent years, the analysis of exhaled breath condensate samples has been given great weight as a noninvasive methodology of studying physiology and lung diseases. The present study describes a device for measuring exhaled breath condensate that is affordable, easily constructed, portable and suitable for use in the field, as well as allowing the collection of simultaneous samples. The results obtained with this device in terms of the concentrations of pH, hydrogen peroxide and nitrite, metabolites related to inflammatory and oxidative damage, in exhaled breath condensate samples are comparable to those obtained with other devices previously described.

Keywords: Exhalation; Lung diseases; Equipment design.

Resumen

El análisis de muestras de aire espirado condensado ha cobrado gran relevancia en los últimos años como método no invasivo de estudio de la fisiología y las enfermedades de origen pulmonar. En el presente trabajo se describe un equipo para tomar muestras de aire espirado condensado de bajo costo, fácil de fabricar, de transportar al terreno y que permite tomar muestras en forma simultánea. La concentración de metabolitos relativos a procesos inflamatorios y al daño oxidativo (pH, peróxido de hidrógeno y nitrito) de muestras de aire espirado condensado obtenido con este equipo son comparables a los reportados con otros previamente.

Descriptores: Espiración; Enfermedades pulmonares; Diseño de equipo.

In recent years, the analysis of exhaled breath condensate (EBC) has been proposed as a noninvasive methodology of studying lung diseases.⁽¹⁾ This tool has been used to search for mechanisms as well as to perform clinical follow-up of various pulmonary pathologies.^(2,3) Exhaled breath is returned to the environment at a temperature of approximately 37°C, being saturated with water together with metabolism products and lung epithelial surface derivatives. Cooling of exhaled air by condensers captures part of this exhaled air through a system of hoses and tubes that offer little resistance to respiration. The product of this process is a transparent liquid containing volatile and nonvolatile particles, the concentrations of which are expressed using measures as small as micromoles per liter. Commercial devices have been developed for collecting EBC samples. Among such devices, the most widely used are the RTube™ (Respiratory Research Inc., Charlottesville, VA, USA) and the ECoScreen (Jaeger GmbH, Hoechberg, Germany). However, there are various

models constructed by individual investigators for general use,⁽⁴⁾ as well as for use in specific situations such as mechanical ventilation⁽⁵⁾ or sample collection from suckling infants.⁽⁶⁾ The particular interest of the investigators of the present study was to develop an EBC condenser that is affordable and portable, as well as allowing the collection of simultaneous samples, use in several experimental situations and use in patients with pathologies of pulmonary origin, either in hospitals or in the field, for the follow-up evaluation of exercise tolerance, as well as the effects of air contaminants, altitude and work.

Description of the device

Figure 1 presents a model of the device.

1) Connection to the condenser: Patients can be connected to the condenser via a mouthpiece or a mask. Although the mask is better tolerated by subjects, the mouthpiece allows the formation of approximately

* Study carried out at the *Universidad Mayor* School of Medicine, Santiago, Chile.

Correspondence to: Oscar Araneda Valenzuela. Camino la Pirámide, 5750, Huechuraba, Santiago, Chile.

Tel 56 02 3281295, E-mail: oscar.aranedav@mayor.cl

Financial support: none.

Submitted: 17 February 2008. Accepted, after review: 26 May 2008.

twice as much EBC in the same amount of time. For both forms of connection, a saliva trap should be used in order to avoid sample contamination.

- 2) One-way system: The one-way design allows the device to condense only the exhaled air and avoid contamination with substances in the environment. In our device, we adapted two valves, each measuring 22 mm in diameter (catalog numbers 1664 and 1665; Hudson RCI, Durham, NC, USA).
- 3) Flexible connector: The flexible connector allows subjects to move and adapt to a more comfortable position without interrupting or increasing resistance to exhalation. This can be constructed using a tube measuring 15 cm in length and 22 mm in internal diameter (catalog number 60-50-150-1; VBM Medizintechnik GmbH, Sulz, Germany).
- 4) Flexible heater: The device includes a mesh-covered electrical resistor whose ends are connected to a regulator that maintains the temperature at 37°C, preventing condensation in this area and increasing the collection yield.
- 5) Glass condenser: A Y-shaped glass condenser is used. The condenser has two upper arms, set at 45° angles, each

measuring 120 mm in length and 8 mm in internal diameter. The flexible connector is attached to one end, and a hose, which allows the outflow of air, is connected to the other. At its lower end, the condenser has a third arm, measuring 40 mm in length, to which a plastic tube, which collects the sample, is inserted under pressure. In order to increase the EBC flow collected, more than one glass condenser, joined by flexible connectors, can be used.

- 6) Cooling system: A box containing crushed ice (-5°C), a mixture of ice and salt (-15°C) or ice packs (-15°C) can be used as a cooling system. The sample volume collected depends on the temperature and on the number of glass condensers used. As a reference, in an adult subject, 1.5 mL can be collected in 15 min when using crushed ice and a single condenser. Approximately twice as much is collected in the same amount of time when using two glass condensers and a mixture of ice and salt.

Note: The device was designed to be portable and to allow easy assembly/disassembly, as well as allowing the collection of simultaneous samples. When collecting samples from patients with pathologies of infectious origin, its parts can be discarded after use. However, the glass condenser can be sterilized and reused.

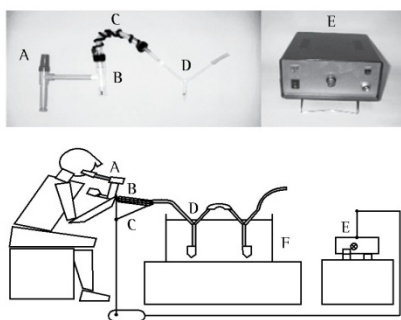


Figure 1 - Structure of the EBC condenser: (above) condensation system and temperature regulator; (below) general outline for assembling the device. Parts: (A) vertical mouthpiece and saliva trap; (B) one-way valves; (C) flexible tube and heater; (D) glass condenser; (E) temperature regulator; and (F) box containing ice.

Sample collection protocol

We recommend that subjects be comfortably seated, at rest and wearing a nose clip. Prior to sample collection, subjects should not eat for one hour and should not smoke for six hours. Due to the lower cost and the greater volume of condensate collected, we recommend that the mixture of ice and salt be used as the cooling method. Total time to collection under these conditions is 10 min or until subjects produce a sample of 1.5-2 mL (Table 1).

Chemical determinations

Various parameters, such as markers of inflammation, remodeling and tissue oxidative damage, have been determined in EBC samples.^(2,3) Using the EBC condenser described in the present study, the concentrations of hydrogen peroxide, nitrite and pH were determined by different

methods (Table 1), as were the concentrations of malondialdehyde,⁽⁷⁾ 8-isoprostane and protein (data not shown). Although our condenser was not directly compared with others, the values revealed by the chemical analysis of the samples collected using the EBC condenser described here are at a level similar to previously reported values obtained using other condensers in healthy subjects (Table 1). In the future, this comparison should be carried out in order to allow a statistical analysis, which was not performed in the present report. Regarding the influence of the type of EBC condenser on the results, there have been reports in which other condensers were used indicating differences for parameters such as pH,⁽⁸⁻⁹⁾ whereas others show no differences for aldehydes (malondialdehyde, hexanal, heptanal or nonanal).⁽¹⁰⁾ Similarly, one group of authors,⁽¹¹⁾ using four different types of condensers, found no differences in condensate volume, nor in the concentration of hydrogen peroxide, 8-isoprostane or cytokine. This suggests that, in the search for standardization of EBC sample collection, it is necessary to standardize and describe the conditions under which samples are collected and handled, this probably being more important than is the type of condenser used. To date, there is no definite evidence that one condenser is more appropriate than others for collecting reproducible samples as suggested in the American Thoracic Society and the European Respiratory Society consensus on EBC collection methodology.⁽²⁾

In summary, the device described in the present study corresponds to a low cost system that has disposable parts and allows the collection of simultaneous samples from subjects under various environmental and experimental situations, providing results similar to those obtained with other EBC condensers previously described.

Acknowledgments

We wish to thank Mr. Luis Pizarro Zúñiga for his assistance in sample collection and chemical analysis. We would also like to thank Dr. Claus Behn for his comments and for facilitating the performance of the present study.

References

- Hunt J. Exhaled breath condensate: an overview. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27(4):587-96; v.
- Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26(3):523-48.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest.* 2006;130(5):1541-6.
- van Beurden WJ, Harff GA, Dekhuijzen PN, van den Bosch MJ, Creemers JP, Smeenk FW. An efficient and reproducible method for measuring hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Respir Med.* 2002;96(3):197-203.
- Walsh BK, Mackey DJ, Pajewski T, Yu Y, Gaston BM, Hunt JF. Exhaled-breath condensate pH can be safely and continuously monitored in mechanically ventilated patients. *Respir Care.* 2006;51(10):1125-31.
- Moeller A, Franklin P, Hall GL, Horak F Jr, Wildhaber JH, Stick SM. Measuring exhaled breath condensates in infants. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41(2):184-7.

Table 1 - Concentrations of hydrogen peroxide nitrite and pH in the EBC samples collected with the exhaled air condenser described and literature values for samples collected with other condensers. The values found using the condenser described in the present study were obtained in samples collected from healthy, male nonsmokers (between 18 and 35 years of age), who were seated and at rest, using a mixture of ice and salt as the cooling system. Results are expressed as means \pm SD and as median and interquartile range (25th-75th percentiles).

Parameter	Concentration obtained	Values in the literature	
H ₂ O ₂ (μ M)	0.53 \pm 0.55 n = 26	0.45 \pm 0.29 n = 12	Nowak et al. 2001 ⁽¹²⁾
NO ₂ (μ M)	1.59 \pm 1.00 n = 17	0.55 (0.31 - 2.33) ^a n = 20 1.8 \pm 0.3 n = 10	Hunt et al. 2001 ⁽¹³⁾ Nightingale et al. 1999 ⁽¹⁴⁾
pH	7.69 \pm 0.24 n = 37	7.8 \pm 0.6 ^b n = 122	Paget-Brown et al. 2006 ⁽¹⁵⁾

H₂O₂: hydrogen peroxide; and NO₂: nitrite. ^aParameters: The concentration of H₂O₂ was determined by spectrophotometry (FOX) with the addition of sorbitol, according to Gay & Gebicki 2002.⁽¹⁶⁾ The concentration of pH was determined after aeration with argon, according to Paget-Brown et al. 2006.⁽¹⁵⁾ The concentration of NO₂ was determined by the Griess reaction, according to Green et al. 1982.⁽¹⁷⁾ ^bCorresponds to the group of patients between 21 and 30 years of age.

7. Araneda OF, García C, Lagos N, Quiroga G, Cajigal J, Salazar MP, et al. Lung oxidative stress as related to exercise and altitude. Lipid peroxidation evidence in exhaled breath condensate: a possible predictor of acute mountain sickness. *Eur J Appl Physiol.* 2005;95(5-6):383-90.
8. Leung TF, Li CY, Yung E, Liu EK, Lam CW, Wong GW. Clinical and technical factors affecting pH and other biomarkers in exhaled breath condensate. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41(1):87-94.
9. Prieto L, Ferrer A, Palop J, Domenech J, Llusar R, Rojas R. Differences in exhaled breath condensate pH measurements between samples obtained with two commercial devices. *Respir Med.* 2007;101(8):1715-20.
10. Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Cagliari A, Poli D, et al. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1380-6.
11. Rosias PP, Robroeks CM, Kester A, den Hartog GJ, Wodzig WK, Rijkers GT, et al. Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers. *Eur Respir J.* 2008;31(5):934-42.
12. Nowak D, Kalucka S, Białasiewicz P, Król M. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(2):178-86.
13. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA, et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 Pt 1):694-9.
14. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax.* 1999;54(12):1061-9.
15. Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A, Bunyan D, Hom S, Nguyen A, et al. Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest.* 2006;129(2):426-30.
16. Gay CA, Gebicki JM. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal Biochem.* 2002;304(1):42-6.
17. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-8.

About the authors

Oscar Florencio Araneda Valenzuela

Professor of Human Physiology. *Universidad Mayor* School of Medicine, Santiago, Chile.

Maria Paulina Salazar Encina

Pediatrician at the Luis Calvo Mackenna Hospital, Santiago, Chile.



Jornal Brasileiro de Pneumologia

Country: [Brazil](#)

Subject Area: [Medicine](#)

Subject Category: [Pulmonary and Respiratory Medicine](#) 

Publisher: [Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia](#). Publication type: Journals. ISSN: 18063756, 18063713

Coverage: 2004-2010

H Index: 11

Scope:

The Jornal Brasileiro de Pneumologia is the official organ of the Brazilian Thoracic Society. It continues the Jornal de Pneumologia, [...]

[Show full scope](#)



- Home
- Journal Rankings
- Journal Search
- Country Rankings
- Country Search
- Compare
- Map Generator
- Help
- About Us

Show this information in your own website

Indicator	2003-2010	Value
SJR		0,07
Cites per doc		0,97
Total cites		449

www.scimagojr.com

Display journal title
 Just copy the code below and paste within your html page:

How to cite this website?



Journal Search

Search query in Journal Title
 Exact phrase

Jornal Brasileiro de Pneumologia

Country: [Brazil](#)
 Subject Area: [Medicine](#)
 Subject Category: [Pulmonary and Respiratory Medicine](#)
 Publisher: [Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia](#). Publication type: Journals. ISSN: 18063756, 18063713
 Coverage: 2004-2010

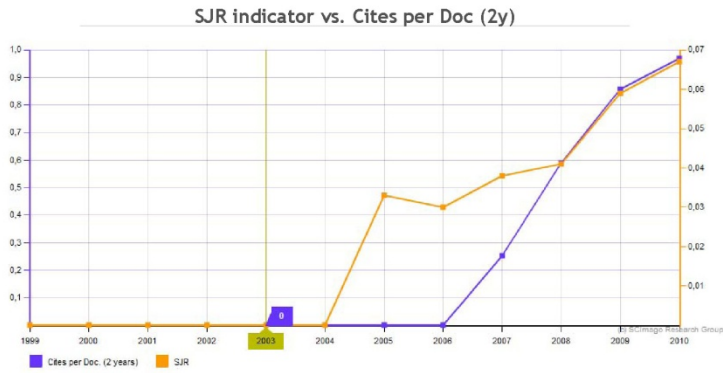
H Index: 11

Scope:

EST MODUS IN REBUS
 Horatio (Satire 1,1,106)

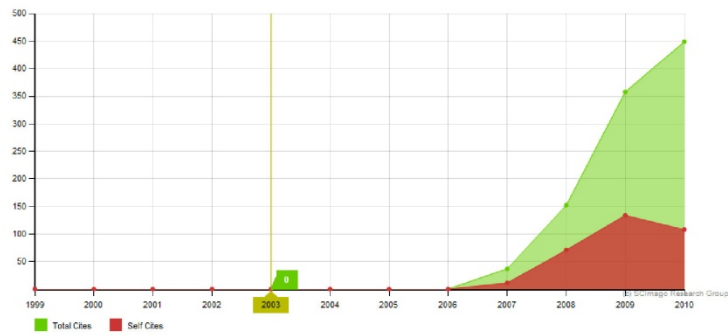
The Jornal Brasileiro de Pneumologia is the official organ of the Brazilian Thoracic Society. It
 Pneumologia, [...]
[Show full scope](#)

[Charts](#) [Data](#)



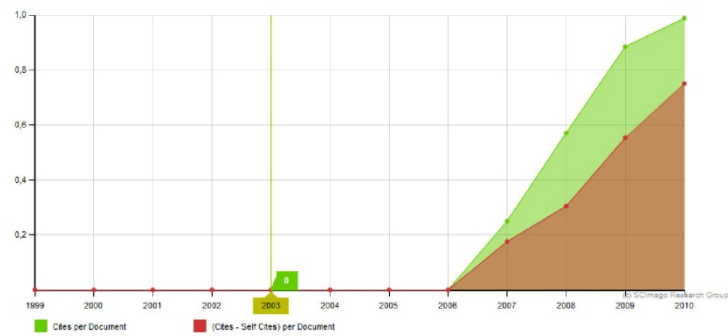
The SJR indicator measures the scientific influence of the average article in a journal, it expresses how central to the global scientific discussion an average article of the journal is. Cites per Doc. (2y) measures the scientific impact of an average article published in the journal, it is computed using the same formula that journal impact factor™ (Thomson Reuters).

Citation vs. Self-Citation



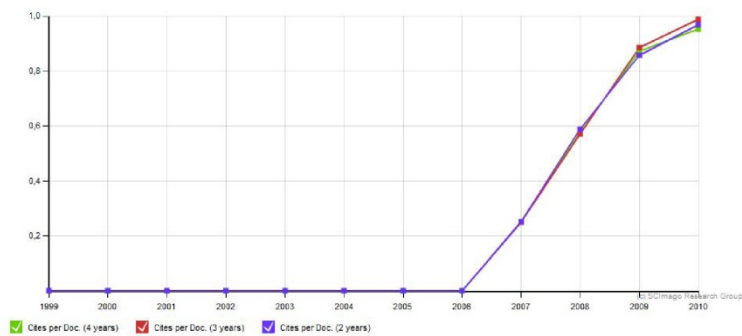
Evolution of the total number of citations and journal's self-citations received by a journal's published documents during the three previous years.

Cites per Document vs. External Cites per Document

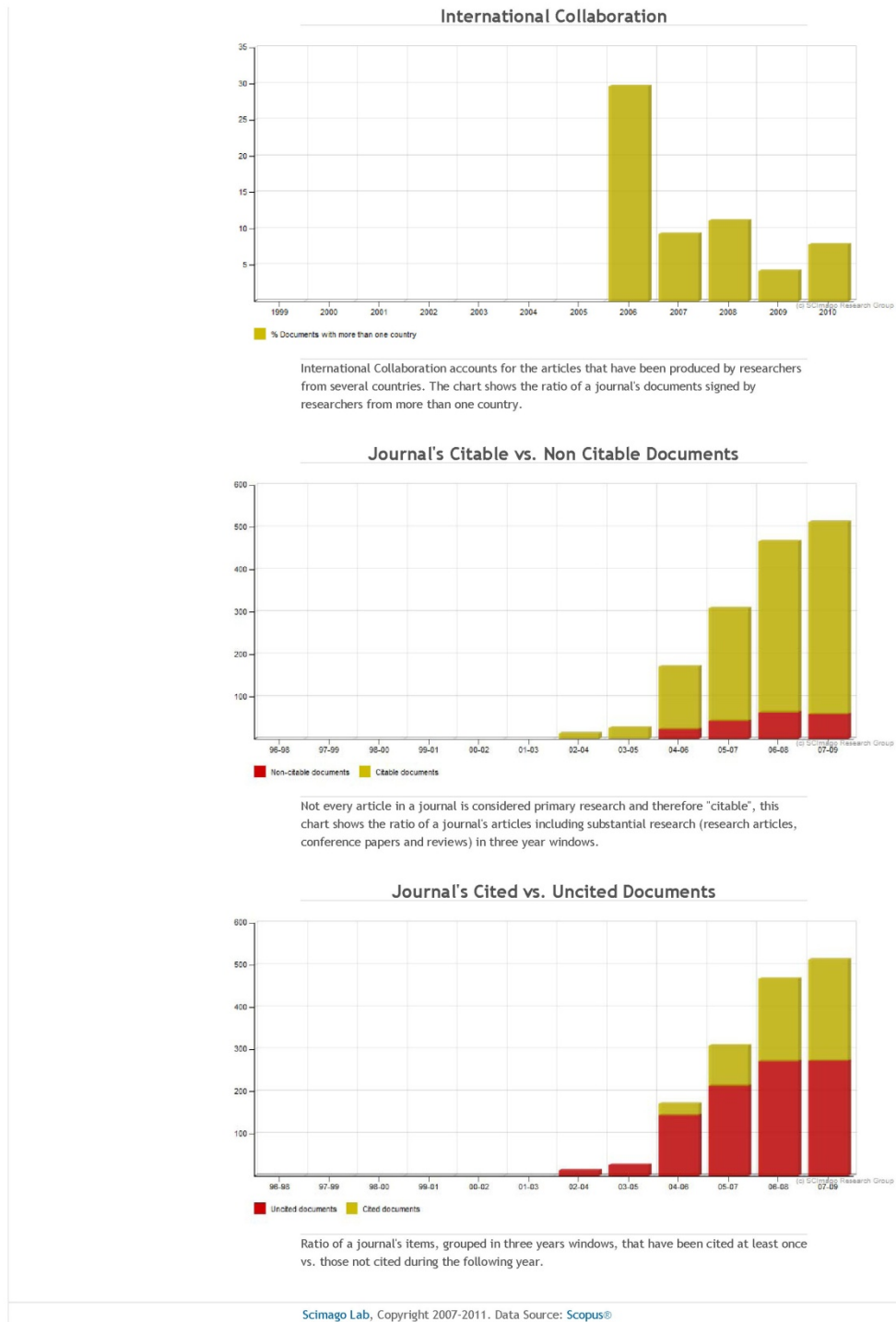


Evolution of the number of total cites per document and external cites per document (i.e. journal self-citations removed) received by a journal's published documents during the three previous years.


Cites per Document in 2, 3 and 4 years windows



Evolution of Citations per Document to a journal's published documents during the two, three and four previous years. The two years line is equivalent to journal impact factor™ (Thomson Reuters) metric.



Subject Category: Pulmonary and Respiratory Medicine. Year: 2009.

Title	SJR	H index	Total Docs. (2009)	Total Docs. (3years)	Total Refs.	Total Cites (3years)	Citable Docs. (3years)	Cites / Doc. (2years)	Ref. / Doc.	Country
Jornal Brasileiro de Pneumologia	Q3 0,061	9	191	467	3.980	357	404	0,85	20,84	

Subject Category: Physiology. Year: 2009.

Artículo 2:

Heinicke I, Boehler A, Rechsteiner T, Bogdanova A, Jelkmann W, Hofer M, Rawlings P, Araneda OF, Behn C, Gassmann M, Heinicke K. Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate. *Eur J Appl Physiol* 2009; 106:599-604.

Eur J Appl Physiol
DOI 10.1007/s00421-009-1014-9

ORIGINAL ARTICLE

Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate

Ilmar Heinicke · Annette Boehler · Thomas Rechsteiner · Anna Bogdanova · Wolfgang Jelkmann · Markus Hofer · Pablo Rawlings · Oscar F. Araneda · Claus Behn · Max Gassmann · Katja Heinicke

Accepted: 5 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Oxidative stress occurs at altitude, and physical exertion might enhance this stress. In the present study, we investigated the combined effects of exercise and moderate altitude on redox balance in ten endurance exercising

The contribution of Max Gassmann and Katja Heinicke who are the senior authors was equivalent.

I. Heinicke · A. Bogdanova · M. Gassmann · K. Heinicke
Vetsuisse Faculty and Zurich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), Institute of Veterinary Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

A. Boehler · T. Rechsteiner · M. Hofer
Division of Pulmonary Medicine, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

I. Heinicke · W. Jelkmann
Institute of Physiology, University of Luebeck, Luebeck, Germany

P. Rawlings · O. F. Araneda · C. Behn
Faculty of Medicine, Universidad Mayor, Santiago, Chile

C. Behn
Extreme Environments Laboratory, Program of Physiology and Biophysics, ICBM, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile

C. Behn
Faculty of Medicine, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

C. Behn
International Center for Andean Studies (INCAS), Santiago, Chile

K. Heinicke (✉)
Neuromuscular Center, Institute for Exercise and Environmental Medicine of Presbyterian Hospital, 7232 Greenville Ave. #435, Dallas, TX 75231, USA
e-mail: katjaheinicke@texashealth.org

biathletes, and five sedentary volunteers during a 6-week-stay at 2,800 m. As a marker for oxidative stress, hydrogen peroxide (H₂O₂) was analyzed by the biosensor measuring system EcocheckTM, and 8-iso prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α}) was determined by enzyme immunoassay in exhaled breath condensate (EBC). To determine the whole blood antioxidative capacity, we measured reduced glutathione (GSH) enzymatically using Ellman's reagent. Exercising athletes and sedentary volunteers showed increased levels of oxidative markers at moderate altitude, contrary to our expectations; there was no difference between both groups. Therefore, all subjects' data were pooled to examine the oxidative stress response exclusively due to altitude exposure. H₂O₂ levels increased at altitude and remained elevated for 3 days after returning to sea level ($p \leq 0.05$). On the other hand, 8-iso PGF_{2α} levels showed a tendency to increase at altitude, but declined immediately after returning to sea level ($p \leq 0.001$). Hypoxic exposure during the first day at altitude resulted in elevated GSH levels ($p \leq 0.05$), that decreased during prolonged sojourn at altitude ($p \leq 0.001$). In conclusion, a stay at moderate altitude for up to 6 weeks increases markers of oxidative stress in EBC independent of additional endurance training. Notably, this oxidative stress is still detectable 3 days upon return to sea level.

Keywords Hypoxia · Lung · Hydrogen peroxide · 8-iso prostaglandin F_{2α} · Glutathione

Introduction

Altitude training is frequently used by endurance athletes to improve competition performance at sea level (Levine and Stray-Gundersen 1997). Three to four weeks at moderate altitude is the minimal recommended period required to

maximize the erythropoietic response (Chapman and Levine 2007; Heinicke et al. 2005). However, not all aspects of altitude acclimatization may be beneficial for competing athletes. In particular, it is known that exposure to altitude combined with exercise (Araneda et al. 2005; Bailey et al. 2001; Chao et al. 1999; Pfeiffer et al. 1999; Schmidt et al. 2002), and even exposure to altitude in resting conditions (Bailey et al. 2001), increases reactive oxygen species (ROS) levels/formation, especially in lung and blood. On the other hand, acute physical work per se is a contributor to oxidative stress where mitochondria represent the major source of free radicals (Bailey et al. 2001; Bailey et al. 2004; Sen 1995). Apart from exercise, additional stressors increase oxidative stress at altitude, such as exposure to ultra violet light, lack of dietary antioxidants, cold climate, increased xanthine oxidase activation and catecholamine production, as well as increased reductive stress and generation of free radicals through anoxia/reoxygenation (Askew 2002). Excessive generation of ROS can induce both, a detrimental effect on lipids, proteins, and DNA as well as an adaptive response. Several studies demonstrate the pathophysiological significance of oxidative stress molecules such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and 8-iso prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso $PGF_{2\alpha}$) in relation to cellular inflammation and lung diseases (Makris et al. 2007; Montuschi 2005; Psathakis et al. 2006). H_2O_2 is produced after converting superoxide anions O_2^- to H_2O_2 by superoxide dismutase and is less stable than 8-iso $PGF_{2\alpha}$ that is a product of arachidonic acid oxidation by ROS. Collection of exhaled breath condensate (EBC) offers the opportunity to measure these markers in the lower respiratory tract in a noninvasive manner (Horvath et al. 2005). In addition, maintenance of redox state depends on the efficiency of antioxidant defense systems and the amount of ROS generated. As such, reduced glutathione (GSH) is one of the most important cellular antioxidants that plays a central role in the regulation of redox sensitive signal transduction (Sen 1999).

Despite its impact, there is little knowledge as to whether oxidative stress increases during a prolonged period of exercise at moderate altitude. We hypothesized that a cumulated effect of exercise and hypoxia exists that causes up-regulation of free radical production, and consequently, an increase in oxidative stress markers. Therefore, using EBC and blood we determined oxidative stress response parameters upon exercise or rest during a 6-week-sojourn at moderate altitude (2,800 m).

Methods

Subjects and protocol

Ten healthy, endurance trained biathletes, and five sedentary, control subjects, all 15 volunteers being members of

the Chilean Military “Escuela de Montaña”, who usually live at sea level, were investigated during a 6-week-training camp or stay at moderate altitude (2,800 m) in Portillo, Chile. The subjects gave their written informed consent to participate in this study, which was approved by the Ethical Committee for Humans from the Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago and supported by the headquarter of the Chilean Military. The daily training time of the athletes [four females and six males; mean age (SD), 24.7 ± 1.3 years, 167.2 ± 9.5 cm, 63.1 ± 8.0 kg, BMI 22.5 ± 1.5 kg/m²] was 4–6 h with one rest day per week. Training included extensive cross country skiing, strength training, and shooting technique training. The sedentary control subjects (five males, 30.2 ± 3.3 years, 168.2 ± 5.3 cm, 79.8 ± 7.1 kg, BMI 28.2 ± 1.7 kg/m²) performed mainly office work and regular daily life tasks with no heavy work load. Diet composition and caloric intake was monitored 1 week before and throughout the study. Dietary characteristics were balanced and identical for both test groups. All test subjects were members of the army, a fact that helped to standardize the experimental conditions. EBC (see below) was collected initially 2 weeks prior at sea level, on day 2 (24 h after arrival at altitude) and day 44 at altitude as well as at sea level 3 days after returning from altitude. Capillary blood samples for determination of hemoglobin concentration ([Hb]) and cubital-venous blood samples for reduced GSH were taken initially 2 weeks prior at sea level (670 m), and on days 2 (24 h after arrival at altitude), 13, 24, 34 and 44 at altitude (2,800 m). All data were collected in the morning after a minimum period of 12 h rest for the test subjects.

Exhaled breath condensate (EBC) collection and analysis

Exhaled breath condensate was collected with a self-constructed device as described earlier (Araneda et al. 2005). In brief, prior to the sampling procedure, the subject's mouth was rinsed with distilled water and the nostrils were blocked by cotton stoppers. Expired air was led from a face mask with attached heated tube (40°C) into a glass collector placed in ice at -5°C . Using a trap, saliva was collected in the bottom of the face mask that was not connected to the condenser. About 1.5 ml EBC was collected during a period of 20 min and immediately stored in liquid nitrogen until analyzed.

Hydrogen peroxide (H_2O_2)

Hydrogen peroxide concentration was measured in EBC with the EcocheckTM (Flit GmbH, Berlin, Germany) by using a biosensor as described previously (Gerritsen et al. 2005). In brief, 500 μl EBC are mixed with 500 μl dilution

buffer to adjust the phosphate concentration. H_2O_2 is reduced enzymatically by a peroxidase on the sensor. The electrons are transferred to the sensor electrode by a redox pair where they induce a voltage change, which is proportional to the H_2O_2 concentration.

8-iso prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α})

8-iso PGF_{2α} concentration was determined by an enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), previously tested for its utility to assess 8-iso PGF_{2α} in EBC (Montuschi et al. 2000). The test kit was modified according to the manufacturer's instructions to reach a lower limit of detection of 1 pg/ml.

Blood analysis

Capillary blood samples were immediately analyzed with the GEM Oxygenation Portable Laboratory (OPL), (Instrumentation Laboratory, Munich, Germany) to measure [Hb].

Reduced glutathione (GSH)

GSH was determined in whole blood by analyzing the concentration in erythrocytes that is about 500 times higher than in plasma (Jones 2002). Hundred microliter venous blood was added to 800 μl of precipitation solution containing: 1.67 g of glacial metaphosphoric acid, 0.2 g Na₂EDTA and 30 g NaCl in 100 ml ddH₂O. Samples were left at room temperature for 10 min to reach complete hemoglobin denaturation and were then frozen in liquid nitrogen.

Ellman's reagent (DTNB) was used to evaluate the nonprotein thiol GSH as described earlier (Tietze 1969). After centrifugation (15 min at 5,000g), supernatants were assayed for nonprotein thiols. GSH was measured using a

Lambda 25 UV/VIS spectrometer (Perkin Elmer). Absorption of complexes of GSH with DTNB was measured at 412 nm and a calibration curve was constructed for each experiment using a commercially available GSH standard (Sigma).

Statistics

Statistical analysis was carried out using GraphPad InStat software version 3.06 (San Diego, CA). The nonparametric Friedman test for repeated measures was performed to compare groups by time followed by Dunn's post-hoc test. Comparisons between the single groups (trained vs. sedentary) were analyzed by applying the Mann-Whitney test. The level of statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Increased levels of oxidative stress markers were found at altitude in both groups, trained and sedentary (Table 1). However, we did not detect any significant differences in H_2O_2 , 8-iso PGF_{2α} and GSH levels between the trained and sedentary group at sea level or at altitude. Therefore, the subjects' data were pooled to examine the effect of hypoxia on redox balance. As depicted in Fig. 1, H_2O_2 significantly increased after 44 days at altitude from 60 nmol/l (median), 40–106 nmol/l (interquartile range) at sea level to 131, 118–167 nmol/l, $p \leq 0.05$. The level of H_2O_2 remained elevated even 3 days after returning to sea level (129, 92–194 nmol/l, $p \leq 0.05$) when compared to sea level (-pre) values. 8-iso PGF_{2α} showed a tendency to increase during the stay at altitude (day 2 vs. day 44, from 2.48, 1.90–3.24 to 3.17, 2.37–4.31, pg/ml, Fig. 2) and significantly decreased upon returning to sea level (1.84, 1.58–2.23, pg/ml, $p \leq 0.05$). Finally, Fig. 3 demonstrates that an acute exposure to hypoxia resulted in significantly

Table 1 Effects of prolonged hypoxia and exercise on oxidative stress markers and antioxidative capacity

	Days	H_2O_2 (nmol/l)		8-iso PGF _{2α} (pg/ml)		GSH (μmol/g Hb)	
		Trained	Sedentary	Trained	Sedentary	Trained	Sedentary
Sea level (-pre) 2,800 m altitude	-14	84.30 ± 42.44	45.40 ± 19.79	2.77 ± 0.65	2.95 ± 0.95	4.44 ± 0.90	4.97 ± 0.66
	2	99.20 ± 38.91	93.60 ± 42.47	2.77 ± 0.89	2.60 ± 0.94	5.30 ± 0.93	5.60 ± 0.50
	13	–	–	–	–	4.18 ± 1.06	4.73 ± 0.56
	24	–	–	–	–	4.60 ± 0.71	4.66 ± 1.12
	34	–	–	–	–	3.96 ± 1.05	3.67 ± 0.91
	44	128.20 ± 53.53	169.60 ± 75.33	3.45 ± 1.73	3.65 ± 1.08	3.98 ± 0.94	3.81 ± 0.55
Sea level (-post)	+3	154.10 ± 90.42	150.00 ± 66.35	1.79 ± 0.48	2.06 ± 0.51	–	–

Exhaled breath condensate and blood samples were obtained from all volunteers after a resting period. Values are mean ± SD. H_2O_2 hydrogen peroxide, 8-iso PGF_{2α} 8-iso prostaglandin F_{2α}, GSH reduced glutathione, trained endurance athletes training at moderate altitude ($n = 10$), sedentary control subjects living at moderate altitude ($n = 5$)

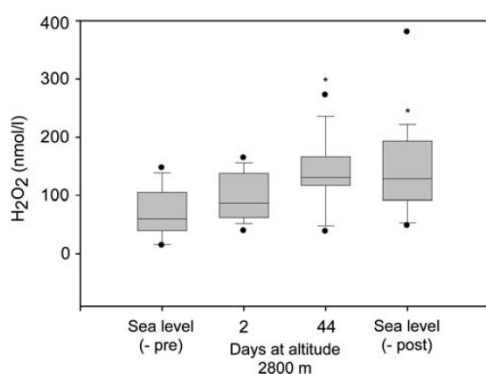


Fig. 1 Changes in hydrogen peroxide (H_2O_2) in response to prolonged hypoxia. Sea level (-pre) values, 2 weeks prior to altitude exposure; sea level (-post) values, 3 days post altitude exposure. Values are given as *box plots* indicating the median (center horizontal line), interquartile range from the 25th to the 75th percentile (*box*), and the 10th and 90th percentiles (*whiskers*). Outliers are presented as *circles*. *Asterisk* indicates significant differences from sea level (-pre) values, $p \leq 0.05$. Pooled data from ten trained and five sedentary control subjects are shown

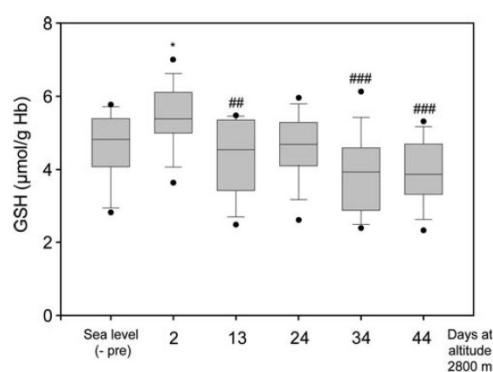


Fig. 3 Time course of reduced glutathione (GSH) at moderate altitude. Sea level (-pre) values, 2 weeks prior to altitude exposure; sea level (-post) values, 3 days post altitude exposure. Values are given as *box plots* indicating the median (center horizontal line), interquartile range from the 25th to the 75th percentile (*box*), and the 10th and 90th percentiles (*whiskers*). Outliers are presented as *circles*. *Asterisk* indicates significant differences from sea level (-pre) values, $p \leq 0.05$; *hash* different from altitude values—day 2, $p \leq 0.05$, *double hash* $p \leq 0.01$, *triple hash* $p \leq 0.001$. Pooled data from ten trained and five sedentary control subjects are shown

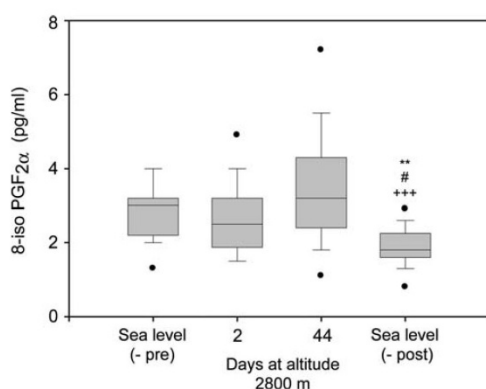


Fig. 2 Changes in 8-iso prostaglandin $\text{F}_2\alpha$ (8-iso $\text{PGF}_2\alpha$) in response to prolonged hypoxia. Sea level (-pre) values, 2 weeks prior to altitude exposure; sea level (-post) values, 3 days post altitude exposure. Values are given as *box plots* indicating the median (center horizontal line), interquartile range from the 25th to the 75th percentile (*box*), and the 10th and 90th percentiles (*whiskers*). Outliers are presented as *circles*. *Asterisk* indicates significant differences from sea level (-pre) values, *hash* different from altitude values—day 2, *plus* different from altitude values—day 44, $p \leq 0.05$. Pooled data from ten trained and five sedentary control subjects are shown

elevated GSH levels [sea level (-pre) vs. day 2, from 4.82, 4.12–5.33 to 5.38, 5.01–6.08, $\mu\text{mol/g Hb}$, $p \leq 0.05$]. GSH levels significantly decreased throughout the stay at

altitude (day 2 vs. day 44, from 5.38, 5.01–6.08 to 3.87, 3.32–4.66 $\mu\text{mol/g Hb}$, $p \leq 0.001$).

Discussion

Contrary to our hypothesis, the present study determined that the effects of two combined oxidative stimuli, chronic hypoxia and training, did not demonstrate a cumulative effect on the redox state in endurance trained athletes compared to sedentary controls. We observed, however, altitude-induced alterations with significantly increased levels of H_2O_2 in EBC at altitude and after return to sea level, a tendency to increased 8-iso $\text{PGF}_2\alpha$ levels in EBC at altitude as well as a depletion of the antioxidant GSH in blood. Our results suggest that living at moderate altitude for an extended period of time is accompanied by a long-term increase in lung oxidative stress independent of strenuous physical exertion in trained subjects.

Earlier studies have shown increased levels of oxidative stress associated with physical work at moderate altitude over a shorter period of time than our study, 11–24 days (Araneda et al. 2005; Chao et al. 1999; Pfeiffer et al. 1999; Schmidt et al. 2002; Vasankari et al. 1997), and 12 hypoxic training sessions during 6 weeks (Pialoux et al. 2006). However, in those studies no sedentary control groups were investigated at altitude and the objective was mainly to investigate the influence of antioxidant supplementation.

It is known that acute exercise in hypoxia (Araneda et al. 2005; Bailey et al. 2001; Joanny et al. 2001; Møller et al. 2001; Pialoux et al. 2006) and normoxia (Bailey et al. 2001; Bailey et al. 2004) increases oxidative stress compared to resting conditions. On the other hand, regular intermittent hypoxic training was leading to attenuated increases in lipid peroxidation and reduced plasma malondialdehyde due to mobilization of α -tocopherol compared with normoxic training (Bailey et al. 2001). The observation that there was no difference between sedentary and endurance trained subjects might be explained by the lower exercise-induced oxidative stress after intermittent hypoxic training. This suggests that controlled ROS generation is required to initiate adaptation to physical stress.

There is evidence that normoxic exercise training results in increased cellular concentrations of antioxidants (Powers et al. 1999). Endurance training can elevate antioxidant enzyme activities in erythrocytes (Miyazaki et al. 2001). It also seems to be capable of reducing DNA damage in white blood cells after exhaustive exercise (Niess et al. 1996), and strengthens GSH dependent tissue antioxidant defense by increasing cellular concentrations of GSH in skeletal muscles (Powers et al. 1999; Sen 1999). However, we found no differences in GSH sea level values between our trained and sedentary subjects. At moderate altitude, both groups followed the same antioxidant pattern. Hypoxic exposure did lead to an increase in GSH-concentration after 24 h; and, GSH levels decreased to normoxic levels during the stay at altitude. Earlier we described a rapid increase in mouse erythrocytes GSH levels on 0.5% O₂ hypoxic exposure in vitro (Bogdanova et al. 2003), and others showed an increase in mouse muscle reduced GSH with acute hypoxia equivalent to an altitude of 7,000 m (Magalhaes et al. 2004), a result that correlates with the observation of suppressed ROS production in hepatocytes primary cultures in response to acute hypoxia (Bogdanova et al. 2005). Chronic hypoxic exposure reduces erythrocytes GSH content (Singh et al. 2001) and triggers activation of glutathione cycle related enzyme activity (Magalhaes et al. 2005) leading to improved antioxidant capacity of blood.

Permanent residence at high altitude was accompanied by increased oxidative stress (Jefferson et al. 2004), and 1 day of high altitude hypoxia in sedentary lowlanders was associated with increased steady-state levels of oxidative DNA damage (Møller et al. 2001). However, prolonged hypoxic exposure in lowlanders showed an adaptive response to oxidative stress. After 8 weeks at high altitude, similar oxidative DNA damage was found as it was seen at sea level (Lundby et al. 2003). Moreover, after 13 months, the antioxidant defense was upregulated, e.g. as identified by elevated whole blood GSH levels (Vij et al. 2005).

In our study, oxidative stress persisted upon returning to sea level for 3 days. Indeed, there are reports of continued increased levels of lipid peroxidase (Joanny et al. 2001), increased levels of H₂O₂ (Araneda et al. 2005) after a prolonged stay at high altitude, and increased polarity of the erythrocyte membrane bilayer surface with increased formation of malondialdehyde after a short-term stay at moderate altitude (Gonzalez et al. 2005).

In conclusion, 6 weeks of endurance training at moderate altitude did not result in an additional long-term increase in lung oxidative stress in trained compared to sedentary subjects. In addition, oxidative stress remained elevated upon returning to sea level. These observations suggest that the increased oxidative stress is due to exposure to moderate altitude. Our data imply that a protective adaptation to physical stress occurred in athletes that adjusts the systemic homeostasis. However, the physiological consequences of increased lung oxidative stress at moderate altitude remain to be elucidated.

Acknowledgments We thank the subjects from the Chilean army for their enthusiastic contribution and gratefully acknowledge technical support from Gisela Kuhn, Stephan Keller and Bianca Rohde-Saam. Johannes Vogel is acknowledged for fruitful discussions. This work has been supported by the Eidgenössische Sportkommission (ESK) des Bundesamtes für Sport (BASPO), by the Swiss National Science Foundation (3100A0-100214) and by the Fensterfabrik Albsrieden, Zurich, Switzerland (U. & G. Frei).

References

- Araneda OF, Garcia C, Lagos N, Quiroga G, Cajal J, Salazar MP, Behn C (2005) Lung oxidative stress as related to exercise and altitude lipid peroxidation evidence in exhaled breath condensate: a possible predictor of acute mountain sickness. *Eur J Appl Physiol* 95:383–390. doi:10.1007/s00421-005-0047-y
- Askew EW (2002) Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology* 180:107–119. doi:10.1016/S0300-483X(02)00385-2
- Bailey DM, Davies B, Young IS (2001) Intermittent hypoxic training: implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. *Clin Sci (Lond)* 101:465–475. doi:10.1042/CS20010065
- Bailey DM, Young IS, McEneny J, Lawrenson L, Kim J, Barden J, Richardson RS (2004) Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1689–H1699. doi:10.1152/ajpheart.00148.2004
- Bogdanova AY, Ogunshola OO, Bauer C, Gassmann M (2003) Pivotal role of reduced glutathione in oxygen-induced regulation of the Na(+)/K(+) pump in mouse erythrocyte membranes. *J Membr Biol* 195:33–42. doi:10.1007/s00232-003-2042-8
- Bogdanova A, Grenacher B, Nikinmaa M, Gassmann M (2005) Hypoxic responses of Na+/K+ ATPase in trout hepatocytes. *J Exp Biol* 208:1793–1801. doi:10.1242/jeb.01572
- Chao WH, Askew EW, Roberts DE, Wood SM, Perkins JB (1999) Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. *J Nutr* 129:2009–2012
- Chapman R, Levine BD (2007) Altitude training for the marathon. *Sports Med* 37:392–395. doi:10.2165/00007256-200737040-00031

- Gerritsen WB, Zanen P, Bauwens AA, van den Bosch JM, Haas FJ (2005) Validation of a new method to measure hydrogen peroxide in exhaled breath condensate. *Respir Med* 99:1132–1137. doi:10.1016/j.rmed.2005.02.020
- Gonzalez G, Celedon G, Escobar M, Sotomayor C, Ferrer V, Benitez D, Behn C (2005) Red cell membrane lipid changes at 3,500 m and on return to sea level. *High Alt Med Biol* 6:320–326. doi:10.1089/ham.2005.6.320
- Heinicke K, Heinicke I, Schmidt W, Wolfarth B (2005) A three-week traditional altitude training increases hemoglobin mass and red cell volume in elite biathlon athletes. *Int J Sports Med* 26:350–355. doi:10.1055/s-2004-821052
- Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJ, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jobsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen EL, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H (2005) Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 26:523–548. doi:10.1183/09031936.05.00029705
- Jefferson JA, Simoni J, Escudero E, Hurtado ME, Swenson ER, Wesson DE, Schreiner GF, Schoene RB, Johnson RJ, Hurtado A (2004) Increased oxidative stress following acute and chronic high altitude exposure. *High Alt Med Biol* 5:61–69. doi:10.1089/152702904322963690
- Joanny P, Steinberg J, Robach P, Richalet JP, Gortan C, Gardette B, Jammes Y (2001) Operation Everest III (Comex'97): the effect of simulated severe hypobaric hypoxia on lipid peroxidation and antioxidant defence systems in human blood at rest and after maximal exercise. *Resuscitation* 49:307–314. doi:10.1016/S0300-9572(00)00373-7
- Jones DP (2002) Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 348:93–112. doi:10.1016/S0076-6879(02)48630-2
- Levine BD, Stray-Gundersen J (1997) "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J Appl Physiol* 83:102–112
- Lundby C, Pilegaard H, van Hall G, Sander M, Calbet J, Loft S, Moller P (2003) Oxidative DNA damage and repair in skeletal muscle of humans exposed to high-altitude hypoxia. *Toxicology* 192:229–236. doi:10.1016/S0300-483X(03)00328-7
- Magalhaes J, Ascensao A, Soares JM, Neuparth MJ, Ferreira R, Oliveira J, Amado F, Duarte JA (2004) Acute and severe hypobaric hypoxia-induced muscle oxidative stress in mice: the role of glutathione against oxidative damage. *Eur J Appl Physiol* 91:185–191. doi:10.1007/s00421-003-0972-6
- Magalhaes J, Ascensao A, Marques F, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Duarte JA (2005) Effect of a high-altitude expedition to a Himalayan peak (Pumori, 7,161 m) on plasma and erythrocyte antioxidant profile. *Eur J Appl Physiol* 93:726–732. doi:10.1007/s00421-004-1222-2
- Makris D, Paraskakis E, Korakas P, Karagiannakis E, Sourvinos G, Siafakas NM, Tzanakis N (2007) Exhaled breath condensate 8-isoprostane, clinical parameters, radiological indices and airway inflammation in COPD. *Respiration* 75:138–144. doi:10.1159/000106377
- Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H (2001) Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 84:1–6. doi:10.1007/s004210000342
- Moller P, Loft S, Lundby C, Olsen NV (2001) Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB J* 15:1181–1186. doi:10.1096/fj.00-0703com
- Montuschi P (2005) Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clin Chim Acta* 356:22–34. doi:10.1016/j.cccn.2005.01.012
- Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzari N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ (2000) Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1175–1177
- Niess AM, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G (1996) DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med* 17:397–403. doi:10.1055/s-2007-972868
- Pfeiffer JM, Askew EW, Roberts DE, Wood SM, Benson JE, Johnson SC, Freedman MS (1999) Effect of antioxidant supplementation on urine and blood markers of oxidative stress during extended moderate-altitude training. *Wilderness Environ Med* 10:66–74
- Pialoux V, Mounier R, Ponsot E, Rock E, Mazur A, Dufour S, Richard R, Richalet JP, Coudert J, Fellmann N (2006) Effects of exercise and training in hypoxia on antioxidant/pro-oxidant balance. *Eur J Clin Nutr* 60:1345–1354. doi:10.1038/sj.ejcn.1602462
- Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C (1999) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 31:987–997. doi:10.1097/00005768-199907000-00011
- Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, Loukides S, Panagou P, Polychronopoulos V, Siafakas NM, Bourous D (2006) Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest* 36:362–367. doi:10.1111/j.1365-2362.2006.01636.x
- Schmidt MC, Askew EW, Roberts DE, Prior RL, Ensign WY Jr, Hesslink RE Jr (2002) Oxidative stress in humans training in a cold, moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wilderness Environ Med* 13:94–105
- Sen CK (1995) Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 79:675–686
- Sen CK (1999) Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Mol Cell Biochem* 196:31–42. doi:10.1023/A:1006910011048
- Singh SN, Vats P, Kumria MM, Ranganathan S, Shyam R, Arora MP, Jain CL, Sridharan K (2001) Effect of high altitude (7,620 m) exposure on glutathione and related metabolism in rats. *Eur J Appl Physiol* 84:233–237. doi:10.1007/s004210170010
- Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27:502–522. doi:10.1016/0003-2697(69)90064-5
- Vasankari TJ, Kujala UM, Rusko H, Sarna S, Ahotupa M (1997) The effect of endurance exercise at moderate altitude on serum lipid peroxidation and antioxidative functions in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75:396–399. doi:10.1007/s004210050178
- Vij AG, Dutta R, Satija NK (2005) Acclimatization to oxidative stress at high altitude. *High Alt Med Biol* 6:301–310. doi:10.1089/ham.2005.6.301

European Journal of Applied Physiology

Country: [Germany](#)

Subject Area: [Biochemistry, Genetics and Molecular Biology](#)

Subject Category: [Physiology](#) 

Publisher: [Springer Verlag](#). Publication type: Journals. ISSN: 14396319, 14396327

Coverage: 1973-1974, 1996-2010

H Index: 62

Scope:

With a focus on human integrative and translational physiology, the European Journal of Applied Physiology publishes original research that is [...]

[Show full scope](#)



SCImago
Journal & Country
Rank

Home
Journal Rankings
Journal Search
Country Rankings
Country Search
Compare
Map Generator
Help
About Us

Journal Search

Search query: in Journal Title

Exact phrase

European Journal of Applied Physiology

Country: [Germany](#)

Subject Area: [Biochemistry, Genetics and Molecular Biology](#)

Subject Category: [Physiology](#) Q3

Publisher: [Springer Verlag](#). Publication type: Journals. ISSN: 14396319, 14396327

Coverage: 1973-1974, 1996-2010

H Index: 62

Scope:

EST MODUS IN REBUS
Horatio (Satire 1,1,106)

With a focus on human integrative and translational physiology, the European Journal of Applied Physiology research that is [...]

[Show full scope](#)

Charts Data

SJR indicator vs. Cites per Doc (2y)



Year	Cites per Doc (2 years)	SJR
2005	1.85	0.138
2006	1.75	0.134
2007	1.95	0.142
2008	1.85	0.136
2009	2.15	0.144
2010	2.25	0.148

The SJR indicator measures the scientific influence of the average article in a journal, it expresses how central to the global scientific discussion an average article of the journal is. Cites per Doc. (2y) measures the scientific impact of an average article published in the journal, it is computed using the same formula that journal impact factor™ (Thomson Reuters).

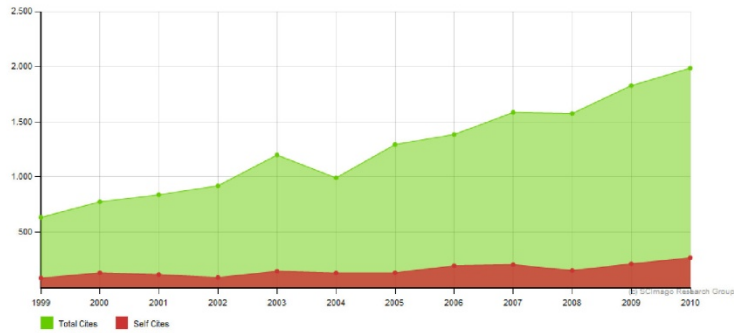
Display journal title
 Just copy the code below and paste within your html page:

```
<a href="http://www.scimagojr.com" style="color: #000080; text-decoration: none;">http://www.scimagojr.com
```

SJR is developed by:

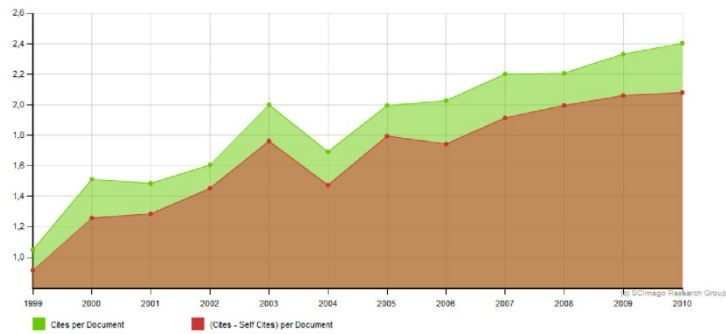
 Powered by 

Citation vs. Self-Citation



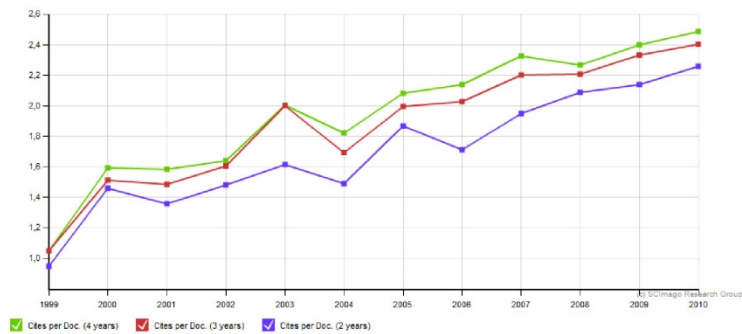
Evolution of the total number of citations and journal's self-citations received by a journal's published documents during the three previous years.

Cites per Document vs. External Cites per Document

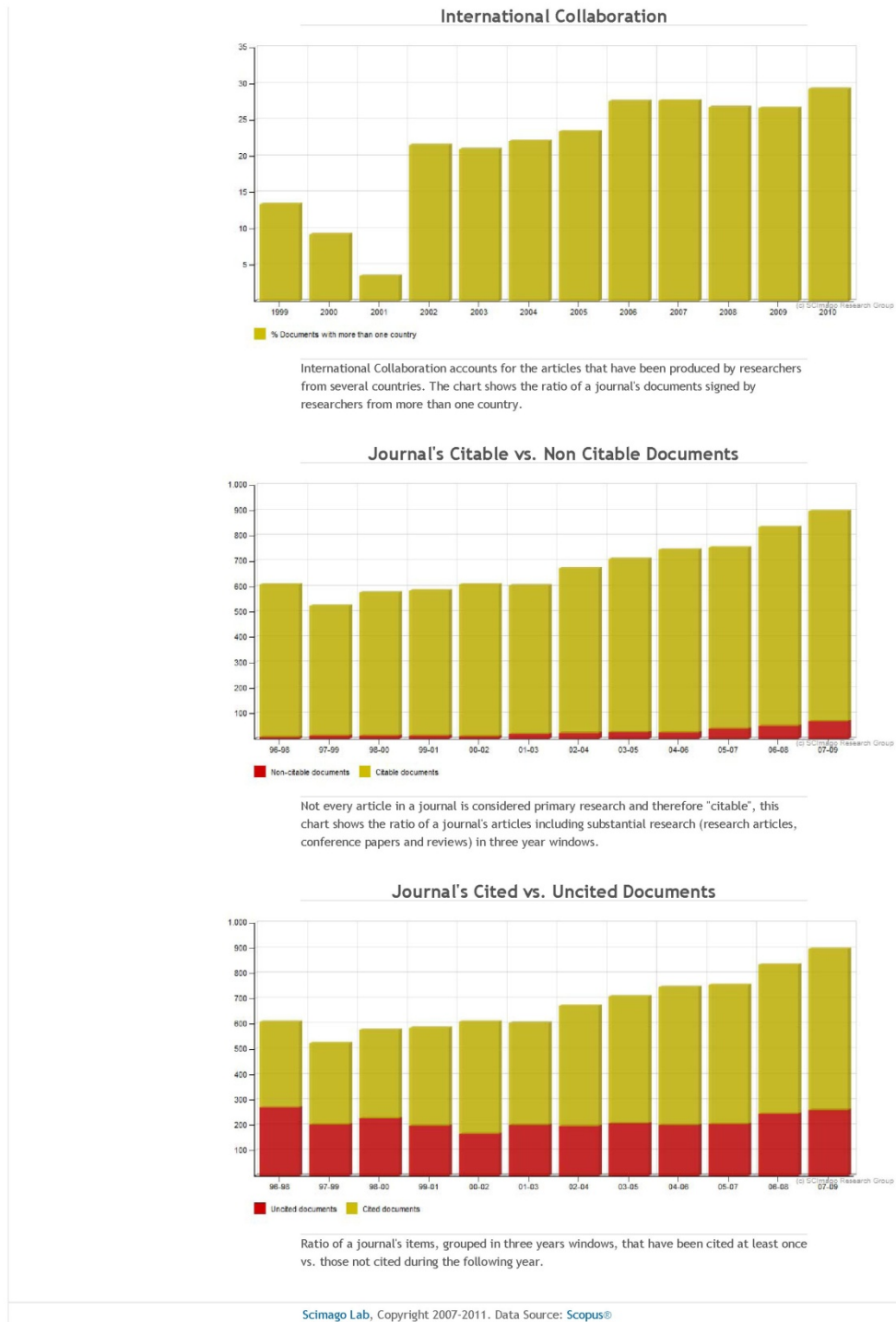




Evolution of the number of total cites per document and external cites per document (i.e. journal self-citations removed) received by a journal's published documents during the three previous years.

Cites per Document in 2, 3 and 4 years windows






Evolution of Citations per Document to a journal's published documents during the two, three and four previous years. The two years line is equivalent to journal impact factor™ (Thomson Reuters) metric.




	Title	SJR	H index	Total Docs. (2009)	Total Docs. (3years)	Total Refs.	Total Cites (3years)	Citable Docs. (3years)	Cites / Doc. (2years)	Ref. / Doc.	Country
1	European Journal of Applied Physiology	 0,145	60	323	835	11.551	1.818	784	2,13	35,76	

Journal: EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY

Mark	Journal Title	ISSN	Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Citable Items	Cited Half-life	Citing Half-life
	EUR J APPL PHYSIOL	1439-6319	10120	2.214	2.526	0.379	393	8.9	8.8
Cited Journal  Citing Journal  Source Data Journal Self Cites									

[CITED JOURNAL DATA](#)

[CITING JOURNAL DATA](#)

 [IMPACT FACTOR TREND](#)

[RELATED JOURNALS](#)

Full Journal Title: EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY

ISO Abbrev. Title: Eur. J. Appl. Physiol.

JCR Abbrev. Title: EUR J APPL PHYSIOL

ISSN: 1439-6319

Issues/Year: 12

Language: ENGLISH

Journal Country/Territory: GERMANY

Publisher: SPRINGER

Publisher Address: 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013

Subject Categories: PHYSIOLOGY

SPORT SCIENCES




ANEXO 6

C) ARTÍCULOS ENVIADOS A PUBLICACION

Araneda OF, Guevara AJ, Contreras C, Lagos N, Berral FJ. Exhaled breath condensate analysis after long distance races. Enviado a International Journal of Sports Medicine en Noviembre 2011

International Journal of Sports Medicine

Journal: INTERNATIONAL JOURNAL OF SPORTS MEDICINE

Mark	Journal Title	ISSN	Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Citable Items	Cited Half-life	Citing Half-life
	INT J SPORTS MED	0172-4622	5450	2.381	2.417	0.379	145	9.5	7.9
Cited Journal  Citing Journal  Source Data Journal Self Cites									

[CITED JOURNAL DATA](#)

[CITING JOURNAL DATA](#)

 [IMPACT FACTOR TREND](#)

[RELATED JOURNALS](#)

Full Journal Title:INTERNATIONAL JOURNAL OF SPORTS MEDICINE

ISO Abbrev. Title:Int. J. Sports Med.

JCR Abbrev. Title:INT J SPORTS MED

ISSN:0172-4622

Issues/Year: 8

Language:ENGLISH

Journal Country/Territory:GERMANY

Publisher:GEORG THIEME VERLAG KG

Publisher Address:RUDIGERSTR 14, D-70469 STUTTGART, GERMANY

Subject Categories:SPORT SCIENCES

Exhaled breath condensate analysis after long distance races

Abstract

Exhaled breath condensate (EBC) was used to evaluate impact of endurance race on pulmonary pro-oxidative formation and lipoperoxidation. Twelve, twelve and seventeen healthy recreational runners, of both sexes, took part in 10, 21.1 and 42.2 km runs, respectively. EBC samples were collected before the run, at 20 and at 80 minutes after the run. Concentrations of H_2O_2 , NO_2^- , malondialdehyde (MDA) and pH were determined. After the run, participants of the 21.1 and 42.2 km circuits showed higher H_2O_2 and NO_2^- concentrations while no variations were observed in the 10 km group. There were no observed changes in MDA concentration within the 10 and 42.2 km groups. pH showed no differences within these groups. $\Delta\text{H}_2\text{O}_2$ y ΔNO_2^- median in the 42.2 km group were higher than in the 10 km group. ΔpH median decreased for the 21.1 and 42.2 km groups. An increase in this parameter was observed in the 10 km group, showing a significantly higher median value than 21.1 and 42.2 km groups. $\Delta\text{H}_2\text{O}_2$ y ΔNO_2^- correlated directly with race time, while ΔpH , showed an inverse correlation. In conclusion, intense prolonged exercise favors the increase in pulmonary pro-oxidative levels, with no modifications on lipoperoxidation. Running time relates to the magnitude of acute post exercise pro-oxidative formation.

Keywords

breath analysis, lung oxidative stress, physical exercise, long distance runners

Introduction

Physical exercise increases pro-oxidative production and favors systemic and organ-specific oxidative stress (OS) [40, 47]. Exercise-induced oxidative stress was initially reported over 30 years ago [11], however, its pulmonary effects have been understudied. In fact, available studies use almost exclusively, animal models. Oxidative stress on proteins [44], lipids [45] and DNA [3] has been reported in lung tissue samples of acutely exercised animals.

One of the most common contexts for OS appearance is an inflammatory process [25], this association is of particular importance since OS has been known to participate in the origin or progression of several pulmonary illnesses [51].

Previously, an inflammatory pattern of airways has been found in endurance sportspeople, determined through the study of bronchial-alveolar lavage and endobrachial biopsy in skiers [49, 42], although direct study of pulmonary tissue has been a source of great contributions, sampling is not risk free and requires special equipment and trained personnel. Currently, non-invasive experimental approaches – such as exhaled NO, nasal lavage and induced sputum- to study pulmonary tissue are available. Using these techniques, oxidative stress and inflammation originated in the airways of cross-country skiers [50], swimmers [38] and endurance runners [5,9] have been described. Along with the aforementioned methods, OS markers have been measured through the use of exhaled breath condensate (EBC) in exercise; Nowak et al. [36], found no differences in H₂O₂ and TBARs concentrations after cycloergometric exercise. Marek et al. [31] found similar results when studying H₂O₂ concentrations. Font-Ribera et al. [14] found no differences in 8-isoprostanes in pool swimmers. Araneda et al. [1] found increases in H₂O₂ and MDA concentrations in EBC of climbers and cyclists in hypobaric hypoxia in the field. A later report, showed

an increase in H₂O₂ and 8-isoprostanes in biathletes training in high altitude [22]. In this paper, acute exercise-induced modifications on pro-oxidative formation measured in EBC samples, obtained in endurance runners at low altitude were evaluated.

Methods

Subjects and protocol

All participants were recreational runners (see Table 1), non-smokers, with no higher or lower respiratory tract illnesses in the last month and had no respiratory system related chronic illnesses (asthma and allergic rhinitis). Also they did not use nutritional supplements, anti-oxidative or anti-inflammatory medications. Participants received verbal and written information and signed an informed consent form. This study meets with the ethical standards of International Journal of Sports Medicine [21], and was approved by the ethics research committee of the University of Valparaiso.

Samples were obtained in six endurance races in the 10 km (10K), 21.1 km (21K) and 42.2 km (42K) categories, carried out in Santiago of Chile between years 2007 and 2010. During the races, EBC samples were taken 30 minutes before (pre), at 20 minutes (20 post) and at 80 (80 post) minutes after the end of the race. Every runner chose the race in which he/she participated. Subject distribution by distance, environmental factors and air contaminant concentrations during the races are described in Table 2.

EBC sample collection was done with a previously described apparatus [1, 2], subjects at rest, with a nasal clip and having previously washed their mouths with distilled water. Sample collection time was of approximately 15 minutes or until 1.5 ml was obtained. Samples were immediately stored in liquid nitrogen and later at – 80

Celsius degrees until their analysis. Because of insufficient EBC sample volume, not all variables were measured in some samples, as noted in results.

Malondialdehyde (MDA)

Concentration of MDA was measured according to Larstad et al. [27]. 300 µl of EBC were mixed with 100 µl of 25mM thiobarbituric acid. The mixture was incubated for one hour at 95 °C. After cooling, first in ice for five min. and for 40 min at room temperature thereafter, the mixture was submitted to high performance liquid chromatography (Shimadzu LC10AD, Corporation, U.S.A.), where a C-18 column 150 mm long and 4,6 mm I.D. (Supelcosil LC-18, Supelco, U.S.A) was used. The mobile phase (1ml/min) was a 20:80 (v/v) mixture of acetonitrile in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8). Measurements were done with a fluorescence detector (RF-551, Shimadzu, U.S.A.), excitation and emission wavelengths, being at 532 and 553 nm respectively. Malondialdehyde bis (diaethylacetal) from Merck (Germany), was applied as standard.

Hydrogen peroxide

It was measured using FOX₂ [35] reagent modified as previously described [1] with added sorbitol according to Gay and Gebicki [15]. 350 µL of EBC were used and 150 µL of modified FOX₂ reagent were added, then the sample was incubated for one hour at room temperature and absorbance was read at 560 nm (Jenway 6405, U.K.). Three curves were made for each measurement with Merck (Germany) H₂O₂ as standard.

pH

It was measured using Paget-Brown et al. [37] protocol. 100 μL of EBC were bubbled with Argon for eight minutes at a flow rate of 350 mL/min and pH was later measured using a 3 x 38 mm (diameter x length) microelectrode (Cole and Palmer) connected to a pH meter (Oakton[®] Acorn pH 6).

Nitrites (NO_2^-)

Nitrite concentration was measured using the spectrophotometric test based on the Griess reaction [18]. 300 μL of Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine-dihydrochloride, 1% sulphanilamide, 3% H_3PO_4) were added to 300 μL de EBC. The mixture was incubated for ten minutes and absorbance was measured at 550 nm. Three curves were made for each measurement, with sodium nitrite as standard.

Statistics

The effect of exercise within each group was analyzed applying the Friedman test for repeated samples, followed later by Dunn's test. For comparisons between basal values and among 42K runners of different races, the Kruskal-Wallis test was used, followed later by Dunn's test. Median for [MDA] and the comparison between 10K runners in different races were contrasted using the Mann-Whitney test. Correlations were studied by determining the Spearman correlation coefficient. The significance level used was of $p < 0.05$. Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism, USA software.

Results

Neither the number of training kilometers the runners run during the week ($p=0.51$) nor the age of runners ($p=0.31$) made any difference. For details, see Table 1.

[H₂O₂] showed no significant changes in the 10K group ($p=0.47$). [H₂O₂] increased on 20 post ($p<0.01$) and on 80 post ($p<0.001$) to the pre-value on the 21K group. The same parameter showed increases in 20 post when compared to pre values in the 42K group ($p<0.01$). There were no differences observed in the pre value among groups ($p=0.14$). For details, see Fig. 1.

[NO₂⁻] in EBC showed no changes in the 10K group ($p=0.93$). In the 21K group, increases were seen when compared pre versus 20 post ($p<0.05$) and 80 post ($p<0.05$) values. Increases were also observed on the 42K group in 20 ($p<0.05$) post and 80 post ($p<0.05$) with respect to the pre value. There were no differences observed in the pre value among groups ($p=0.39$). For details, see Fig. 1.

pH showed no differences within the studied groups. There were no differences observed in the pre value among groups ($p=0.17$). For details, see Fig. 1.

[MDA] was analyzed -at the same stages- only in one group of subjects from 10K and 42K because of insufficient samples. There were no differences observed on this parameter within each group, nor when comparing their basal values. For details, see Fig. 2.

The median of absolute changes in [H₂O₂] showed lower values for 10K versus 21K ($p<0.05$) and 42K ($p<0.001$). In absolute changes of [NO₂⁻] higher value for 42K versus 10K ($p<0.05$) can be observed. The median of absolute changes in pH was higher in 10K than in 21K ($p<0.05$) and 42K ($p<0.05$). For details, see Fig. 3.

The $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ showed a direct correlation with the $\Delta[\text{NO}_2^-]$, ($r=0.72$, $n=36$, $p< 0.0001$). Deltas were obtained from 20 post-pre, see Fig. 5. Total race time on the three groups showed significant correlation with $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ ($r=0.57$, $n=41$, $p< 0.0001$), $\Delta[\text{NO}_2^-]$ ($r=0.42$, $n=38$, $p=0.01$) and ΔpH ($r=-0.39$, $n=31$, $p=0.03$). Deltas were obtained from 20 post - pre. For details, see Fig. 4.

Absolute values of all subjects showed a significant correlation between $[\text{H}_2\text{O}_2]$ *versus* $[\text{NO}_2^-]$ ($r=0.74$, $n=114$, $p< 0.0001$). Significant correlations between $[\text{H}_2\text{O}_2]$ *versus* pH ($r=-0.48$, $n=93$, $p< 0.0001$) and between $[\text{NO}_2^-]$ *versus* pH ($r=-0.48$, $n=84$, $p< 0.0001$) were found.

Using data from different races over the same distance, two 10K sub-groups of runners ($n = 10$) and three sub-groups of 42K runners ($n = 17$) were compared. No differences were found for running time, absolute values and absolute changes, as can be observed in tables 3 and 4 respectively.

Discussion

Human participation in endurance races alters non-enzymatic plasmatic antioxidative levels [6], intracellular antioxidative enzyme activity [30] and creates oxidative stress to lipids [8], proteins [20] and to DNA [34]. These data have been obtained through the analysis of systemic indicators (plasma and urine) and from the study of lymphocytes, erythrocytes and skeletal muscle [39]. On this study, we have focused on the potential oxidative stress on lungs induced by prolonged intense exercise. Our findings show an increase of two important pro-oxidatives (Fig. 1), with no variations on oxidative stress on lipids (Fig. 2).

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ in EBC showed increases in 21K and 42K, with no variations for 10K (Fig. 1).

This biomarker has been previously analyzed during exercise, however, in conditions

hardly comparable to those of our protocol; Nowak et al. [36] in a submaximal exercise on a cycloergometer (120W x 6 minutes) found no differences when comparing before and after exercise. The same result was found after brief maximal exercise (3 minutes) in elite cyclists at 670 and 2160 meters height [1]. Measurements $[H_2O_2]$ during exercise, Marek et al. [31] in a submaximal cycloergometer protocol (approx. 6 minutes at 60W + 5 min at 120W) and later during maximal exercise (300 W) showed no differences [32]. Mercken et al. [33] also, found no differences in maximal exercise in a cycloergometer (approx. 12 minutes) in healthy people, whereas differences were found in patients with obstructive chronic pulmonary illnesses, a pathology characterized by the presence of a pulmonary oxidative imbalance [28]. However, those experiments were carried out during short periods of time, contrasting with the time of our experiments, which probably partially explains the differences with our results, where the $\Delta[H_2O_2]$ median has a tendency to increase depending on the duration of the test, being 10K different from 21K and 42K (Fig. 3). Furthermore, this is confirmed by the correlation between $\Delta[H_2O_2]$ and the time of the test (Fig. 4).

$[NO_2^-]$ in EBC is considered an important marker of oxidative stress and chronic inflammation in airways in patients with cystic fibrosis and asthma [13], as well as in patients with acute lung damage [16]. To the extent of our knowledge, $[NO_2^-]$ has not been previously determined in EBC in conditions similar to those reported on this work. Although metabolism and relation between NO_2^- and NO (its source of origin) are a complex problem yet to be solved [7], observed post marathon increase in exhaled NO [5], hints that it could be one of the sources for the increase of $[NO_2^-]$ in EBC described on this work. This hypothesis must be proven in future research,

since in some pathological situations (cystic fibrosis) increases in $[\text{NO}_2^-]$ have been reported with normal exhaled NO [24].

The same general tendency observed for $[\text{H}_2\text{O}_2]$ was found for $[\text{NO}_2^-]$ in the median of single values (Fig. 1), in the median of absolute changes (Fig. 3) and in its low to moderate correlation with the time of the race (Fig. 4). Also, $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ correlates directly with the $\Delta[\text{NO}_2^-]$ (Fig. 5). A likely explanation for these findings is the probable common origin of both species or that they are part of a common process. $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in EBC correlates to phagocyte activity in peripheral blood [48] and with leucocytes in induced sputum of patients with bronchiectasis [29]. In long distance races, increases in the number of leukocytes in the blood has been described, in addition to their higher capacity to form pro-oxidatives [6, 23]. In induced sputum samples Bonsignore et al. [5] reported increase of post marathon polymorphonuclear neutrophils.

Contradicting previous expectations, the increase in pro-oxidatives did not mean a higher post exercise lipoperoxidation in EBC (Fig. 2). Coincidentally, Nowak et al. [36] evidenced no differences on TBARs in EBC in cycloergometer (120W x 6 minutes). Font-Ribera et al. [14] did not report changes in 8-isoprostane concentration after 40 minutes of swimming in a pool. In hypobaric hypoxia conditions lipoperoxidation increased; [MDA] in EBC increased in climbers over 6000 meters. The same variation was seen in a group of cyclists in a cycloergometer at 2160 meters, while the same protocol elicited no changes at 670 meters [1]. Heinicke et al. [22] reported increases of 8-isoprostanes in EBC on biathletes that trained at high altitude. From the data presented on this work, it is possible to conclude that prolonged and acute exercise is not enough to create oxidative stress *per se* in the

described conditions. It is likely that regular exercise also induces anti-oxidative defenses that prevent acute oxidative stress, as it had been previously reported [4,17]. Since the number of samples analyzed was less than desirable, these results must be further confirmed.

pH in EBC corresponds to a parameter studied in various pathologies. A low value of this parameter has been consistently found in inflammatory processes of the airways and of the lung parenchyma [26]. The study of induced sputum in cross country runners showed that a year's training generates a persistent inflammatory process - with no apparent clinical repercussions- along with an increase in inflammatory cells and of inflammation mediator concentrations (interleukin-8, leukotriene E4 and histamine) [10]. Under acute maximal exercise conditions, increases in prostaglandin E2 and thromboxane B2 in EBC were found when comparing concentrations before and after exercise [41]. Chimenti et al. [9] reported an increase in interleukin-8; an increase of the number of epithelium cells and their apoptosis in induced sputum, along with the increase of Clara cell protein CC-16 in serum, these results were interpreted as inflammation and epithelial damage to the airways after a 21K race.

In this work, Δ pH medians showed a decrease in 21K and 42K groups (Fig. 3), while this parameter increased in the 10K group. In previous studies Marek et al. [32] found no variations in EBC pH in brief maximal exercise. Riediker and Danuser [46] reported an increase in post exercise pH (30 minutes at 60% of maximum heart rate). Greenwald et al. [19] found no differences in acute post exercise in a field study, while pH values in regular runners were inferior to control ones [12]. Although the results of these studies can be compared to the 10K group, intense and more prolonged exercising favors a drop in pH correlated weakly to moderately with the length of the race (Fig. 4). Inverse correlations found between pH and analyzed pro-

oxidatives suggest that the higher production of these species at a pulmonary level, in these conditions, is involved in the inflammatory process and the later observed drop in pH (see results). Similar correlations have been described in asthmatic patients, with chronic obstructive pulmonary disease and bronchiectasis, all pathologies that share a chronic inflammatory process of the airways [43].

A potential shortcoming of this work is related to the different weather conditions and the air contaminant concentration in which samples were obtained (see table 2). In order to test the influence of these factors, samples were taken at the same distance in different races. In 10K competitors (83% of the total sample) –in races 3 and 6 (see table 3)- similar running time and pre value were found. Moreover, differences between $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ and $\Delta[\text{NO}_2^-]$ were not found, although during race 6 –compared to race 3 conditions- there was an O_3 concentration three times higher; an MP_{10} concentration twelve times smaller and an NO_2 concentration eight times smaller. When comparing samples taken from the 100% of the 42K race runners in races 2,4 and 5, no significant differences were found among running times, pre-race values and absolute changes of $[\text{H}_2\text{O}_2]$, $[\text{NO}_2]$ and pH in EBC (see table 4). The comparison of air contaminants between races 2 and 4 (both similar) and race 5, found that the former had O_3 concentration three times higher and MP_{10} concentration 1.5 times smaller than the latter.

This comparison was not done for 21K given the small number of participants in the race, however we speculate that results must be similar. Ferdinands et. al. [12] in previous work, found that exercise does not relate to pH changes at different concentration of air pollutants, furthermore they did not find any correlation with them, pointing in the same direction as the results reported above. Regarding the two

analyzed distances, it is possible to conclude that the probable cause of the EBC modifications found is the exercise done instead of the weather conditions.

Conclusions

Acute, prolonged physical exercise done at low altitude, increases the formation of pro-oxidants (H_2O_2 y NO_2^-) with no evidence of lipidperoxidation (MDA) in EBC samples. Furthermore, pro-oxidant changes and pH are related to the running time. Causes of these phenomena are not known yet and is still to be determined whether the described changes are an expression of a lung-located process or if they are related to an alteration of the systemic redox changes characteristic of these exercise conditions.

Conflict of interest

Authors declare not having conflict of interests of any kind.

References

1. Araneda OF, García C, Lagos N, Quiroga G, Cajigal J, Salazar MP, Behn C. Lung oxidative stress as related to exercise and altitude. Lipid peroxidation evidence in exhaled breath condensate: a possible predictor of acute mountain sickness. *Eur J Appl Physiol* 2005; 95:383-90
2. Araneda OF, Salazar MP. Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate. *J Bras Pneumol* 2009; 35:69-72
3. Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243:678-682
4. Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:224-9
5. Bonsignore MR, Morici G, Riccobono L, Insalaco G, Bonanno A, Profita M, Paternò A, Vassalle C, Mirabella A, Vignola AM. Airway inflammation in

nonasthmatic amateur runners. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:L668-76

6. Briviba K, Watzl B, Nickel K, Kulling S, Bös K, Haertel S, Rechkemmer G, Bub A. A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. *Redox Rep* 2005;10:325-31
7. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med* 2006; 41:691-701
8. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30:1603-7
9. Chimenti L, Morici G, Paterno A, Santagata R, Bonanno A, Riccobono L, Bellia V, Bonsignore MR. Bronchial epithelial damage after a half-marathon in nonasthmatic amateur runners. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298:L857-62
10. Denguezli M, Ben Chiekh I, Ben Saad H, Zaouali-Ajina M, Tabka Z, Abdelkrim Z. One-year endurance training: effects on lung function and airway inflammation. *J Sports Sci* 2008; 26:1351-9
11. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978; 45:927-32
12. Ferdinands JM, Crawford CG, Greenwald R, David Van Sickle D, Hunter E, Teague WG. Breath acidification in adolescent runners exposed to atmospheric pollution: A prospective, repeated measures observational study. *Environmental Health* 2008; 7:10
13. Formanek W, Inci D, Lauener RP, Wildhaber JH, Frey U, Hall GL. Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease. *Eur Respir J* 2002;19:487-91
14. Font-Ribera L, Kogevinas M, Zock JP, Gómez FP, Barreiro E, Nieuwenhuijsen MJ, Fernandez P, Lourencetti C, Pérez-Olabarría M, Bustamante M, Marcos R, Grimalt JO, Villanueva CM. Short-Term Changes in Respiratory Biomarkers after Swimming in a Chlorinated Pool. *Environ Health Perspect* 2010;118:1538-1544
15. Gay CA, Gebicki JM. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal Biochem* 2002; 304:42-6

16. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Lange T, Engelmann L, Schauer J, Wirtz H. Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest* 2003;124:1046-1052
17. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:126-31
18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-8
19. Greenwald R, Ferdinands JM, Teague WG. Ionic determinants of exhaled breath condensate pH before and after exercise in adolescent athletes. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44:768-77
20. Guidi F, Magherini F, Gamberi T, Bini L, Puglia M, Marzocchini R, Ranaldi F, Modesti PA, Gulisano M, Modesti A. Plasma protein carbonylation and physical exercise. *Mol Biosyst* 2010; doi: 10.1039/c0mb00106f
21. Harriss DJ, Atkinson G. Update - ethical standards in sport and exercise science research. *Int J Sports Med.* 2011; 32:819-21.
22. Heinicke I, Boehler A, Rechsteiner T, Bogdanova A, Jelkmann W, Hofer M, Rawlings P, Araneda OF, Behn C, Gassmann M, Heinicke K. Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate. *Eur J Appl Physiol* 2009; 106:599-604
23. Hessel E, Haberland A, Müller M, Lerche D, Schimke I. Oxygen radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running?. *Clin Chim Acta* 2000; 298:145-56
24. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53:680-4
25. Holguin F, Fitzpatrick A. Obesity, asthma, and oxidative stress. *J Appl Physiol* 2010;108:754-9
26. Hunt J. Exhaled breath condensate pH assays. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007; 27:597-606
27. Larstad M, Ljungkvist G, Olin AC, Toren K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 766:107-114

28. Lee W, Thomas PS. Oxidative stress in COPD and its measurement through exhaled breath condensate. *Clin Transl Sci* 2009; 2:150-5
29. Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G, Lachanis S, Panagou P, Siafakas NM. Exhaled H₂O₂ in steady-state bronchiectasis: relationship with cellular composition in induced sputum, spirometry, and extent and severity of disease. *Chest* 2002;121:81–87
30. Machefer G, Groussard C, Rannou-Bekono F, Zouhal H, Faure H, Vincent S, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Extreme running competition decreases blood antioxidant defense capacity. *J Am Coll Nutr* 2004; 23:358-64
31. Marek E, Mückenhoff K, Streckert HJ, Becher G, Marek W. Measurements of L-lactate and H₂O₂ in exhaled breath condensate at rest and mild to moderate exercise in young and healthy subjects. *Pneumologie* 2008; 62:541-7
32. Marek E, Platen P, Volke J, Mückenhoff K, Marek W. Hydrogen peroxide release and acid-base status in exhaled breath condensate at rest and after maximal exercise in young, healthy subjects. *Eur J Med Res* 2009; 14:134-9
33. Mercken EM, Hageman GJ, Schols AM, Akkermans MA, Bast A, Wouters EF. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:994-1001
34. Neubauer O, Reichhold S, Nersesyan A, König D, Wagner KH. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses?. *Exerc Immunol Rev* 2008; 14:51-72
35. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994; 220 :403-409
36. Nowak D, Kalucka S, Białasiewicz P, Król M. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 2001; 15:178-86
37. Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A, Bunyan D, Hom S, Nguyen A, Hunt JF. Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest* 2006; 129:426-30
38. Pedersen L, Lund TK, Barnes PJ, Kharitonov SA, Backer V. Airway responsiveness and inflammation in adolescent elite swimmers. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:322-7

39. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008; 88:1243-76
40. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radic Biol Med* 2010; doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071
41. Pucsok JM, Györe I, Argay K, Huszár E, Barát E, Pucsok J, Horváth I. Effect of exercise on levels of cyclo-oxygenase mediators in exhaled breath condensate in elite athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 2007; 47:223-7
42. Karjalainen EM, Laitinen A, Sue-Chu M, Altraja A, Bjermer L, Laitinen LA. Evidence of airway inflammation and remodeling in ski athletes with and without bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:2086-91
43. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1364-70
44. Radak Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H, Goto S. A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. *Pflugers Arch* 1998; 435:439-441
45. Reddy KV, Kumar TC, Prasad M, Reddanna P. Pulmonary lipid peroxidation and antioxidant defenses during exhaustive physical exercise: the role of vitamin E and selenium. *Nutrition* 1998; 14:448-451
46. Riediker M, Danuser B. Exhaled breath condensate pH is increased after moderate exercise. *J Aerosol Med* 2007; 20:13-8
47. Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:215-23
48. Szkudlarek U, Maria L, Kasielski M, Kaucka S, Nowak D. Exhaled hydrogen peroxide correlates with the release of reactive oxygen species by blood phagocytes in healthy subjects. *Respir Med* 2003; 97:718–725
49. Sue-Chu M, Larsson L, Moen T, Rennard SI, Bjermer L. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage findings in cross-country skiers with and without "ski asthma". *Eur Respir J* 1999; 13:626-32
50. Sue-Chu M, Brannan JD, Anderson SD, Chew N, Bjermer L. Airway hyperresponsiveness to methacholine, adenosine 5-monophosphate,

mannitol, eucapnic voluntary hyperpnoea and field exercise challenge in elite cross-country skiers. *Br J Sports Med* 2010; 44:827-32

51. Ward PA. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1203:53-9

Figures and tables

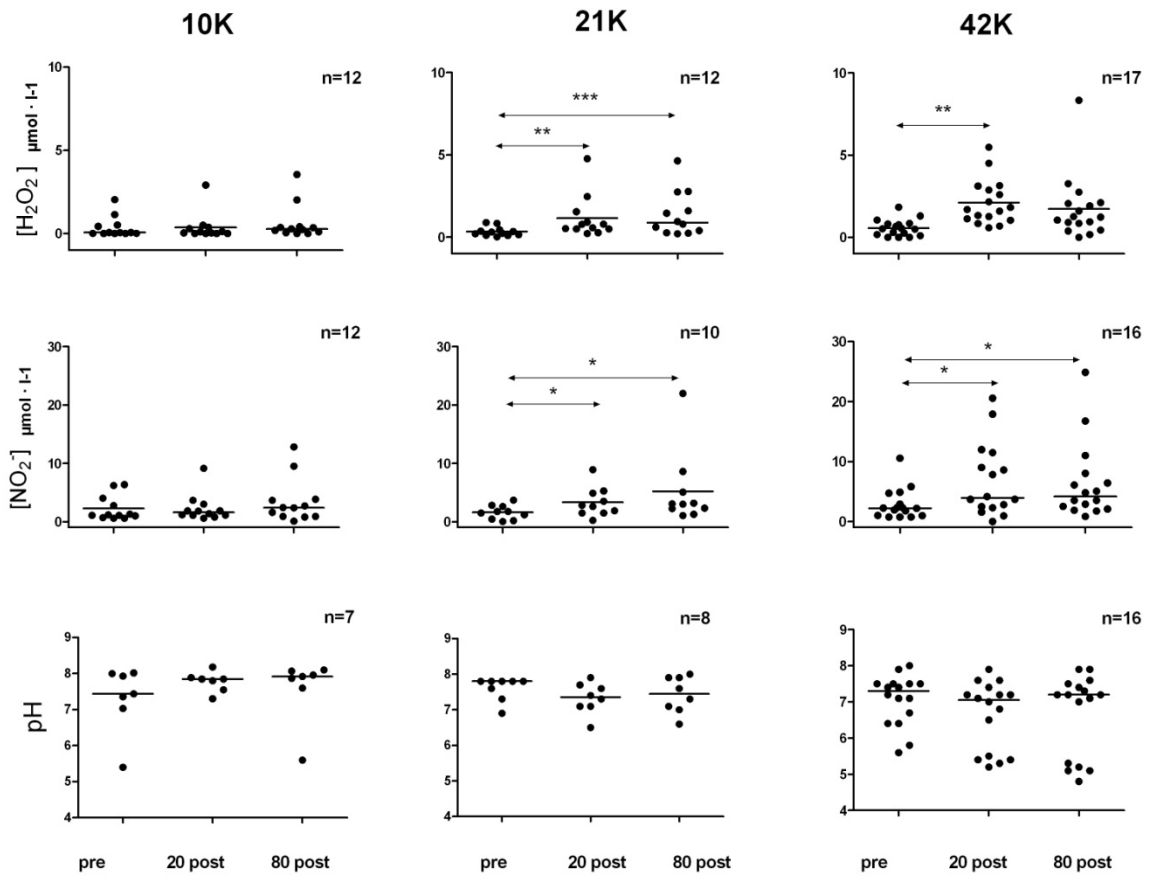


Fig.1 $[\text{H}_2\text{O}_2]$, $[\text{NO}_2^-]$ and pH in EBC in 10, 21 and 42 kilometer runners. The number of individuals is indicated in each graph. Values are expressed as median. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ different from basal for each analyzed distance.

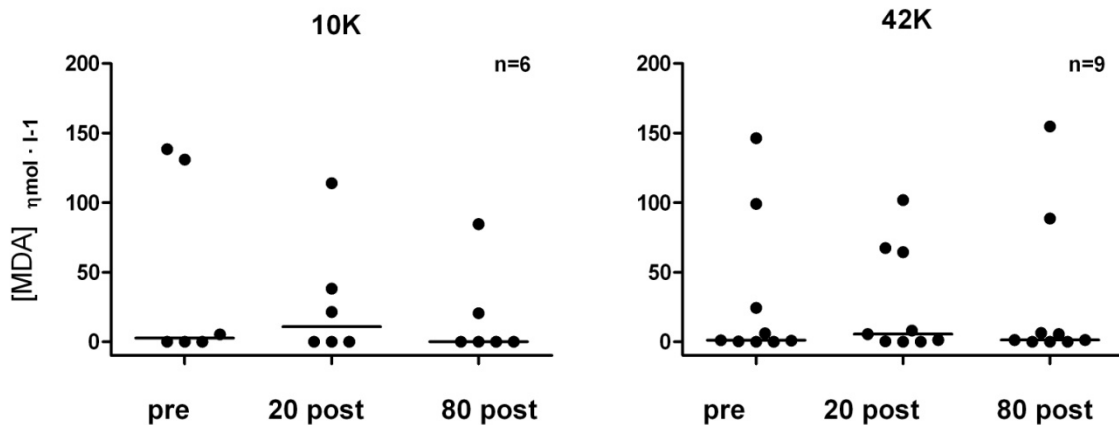


Fig.2 $[\text{MDA}]$ in EBC in 10 and 42 kilometer runners. Values are expressed as median.

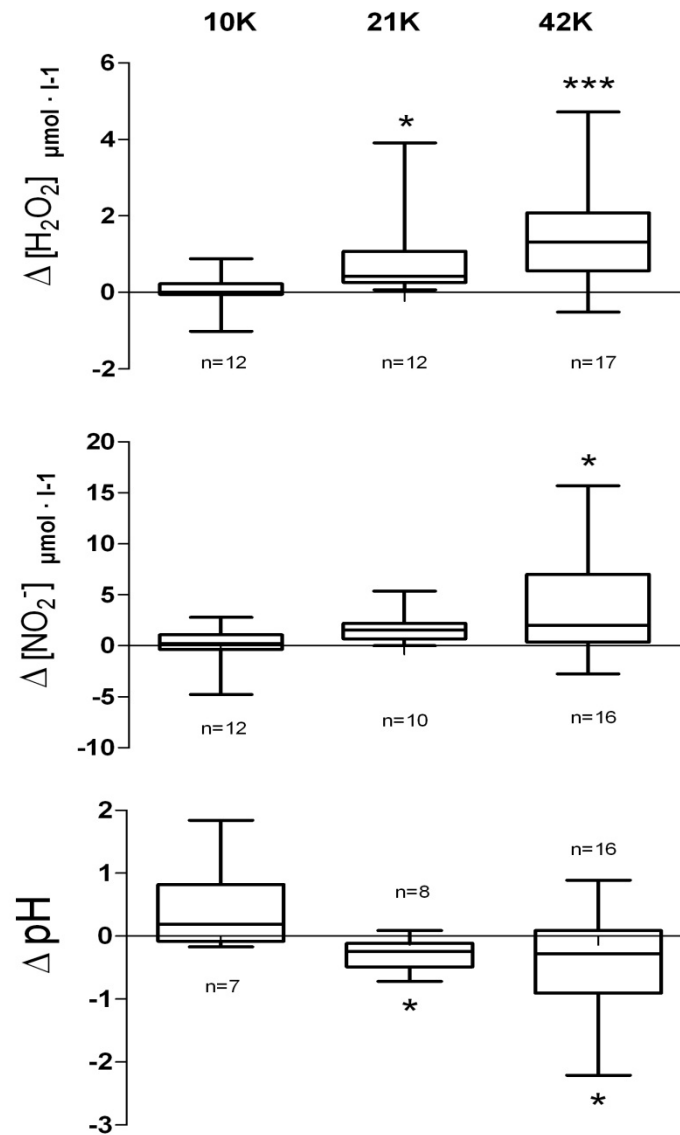


Fig. 3 Absolute changes (20 post-pre) on $[\text{H}_2\text{O}_2]$, $[\text{NO}_2^-]$ and pH in EBC in 10, 21 and 42 kilometer runners. Values are expressed as median, IQR (box) and Min to Max (whiskers), * $p < 0.05$ different from 10K. *** $p < 0.01$ different from 10K.

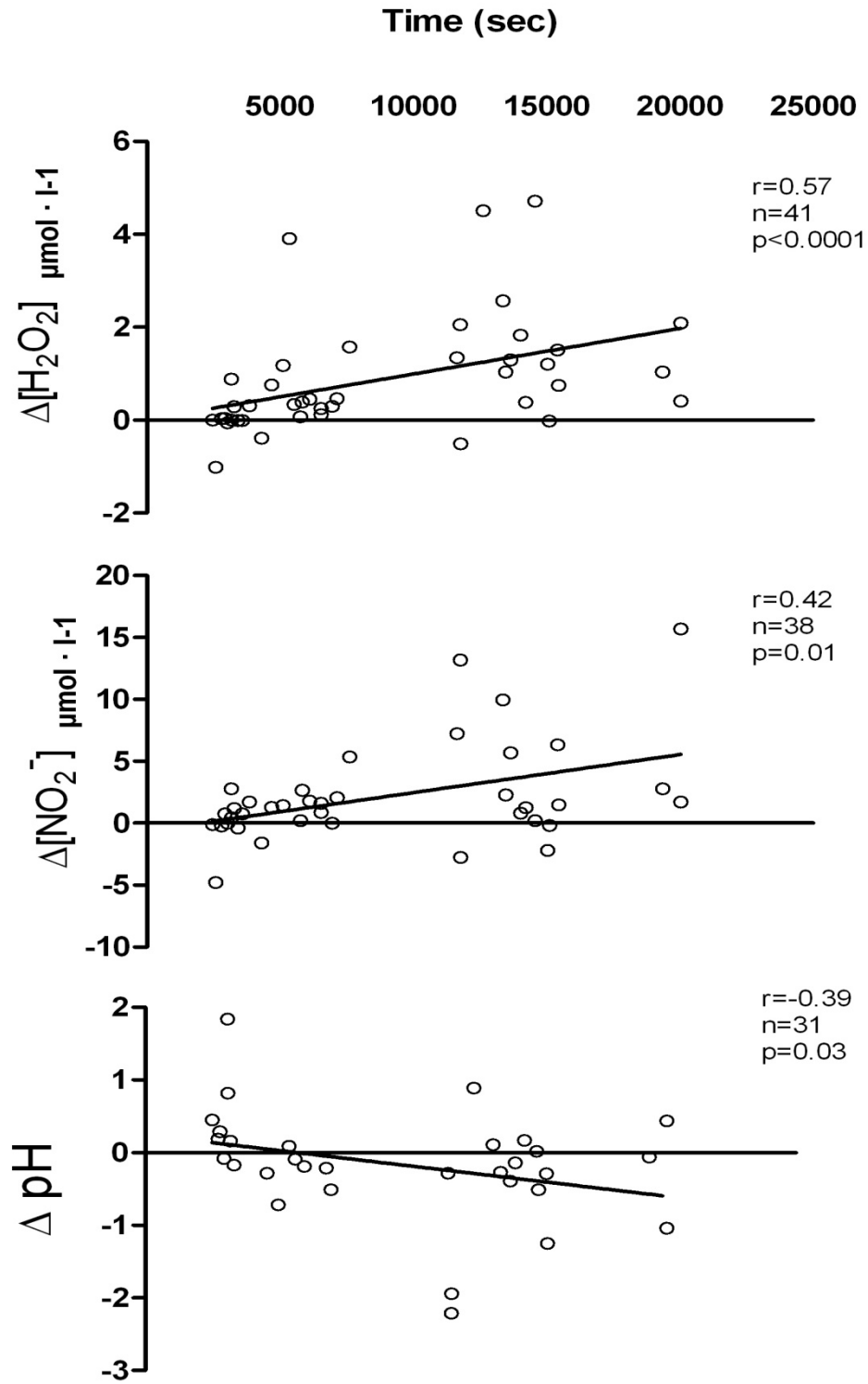


Fig. 4 Relation between absolute changes (20 post-pre) on $[\text{H}_2\text{O}_2]$, $[\text{NO}_2^-]$ and pH in EBC versus total race time in 10, 21 and 42 kilometer runners.

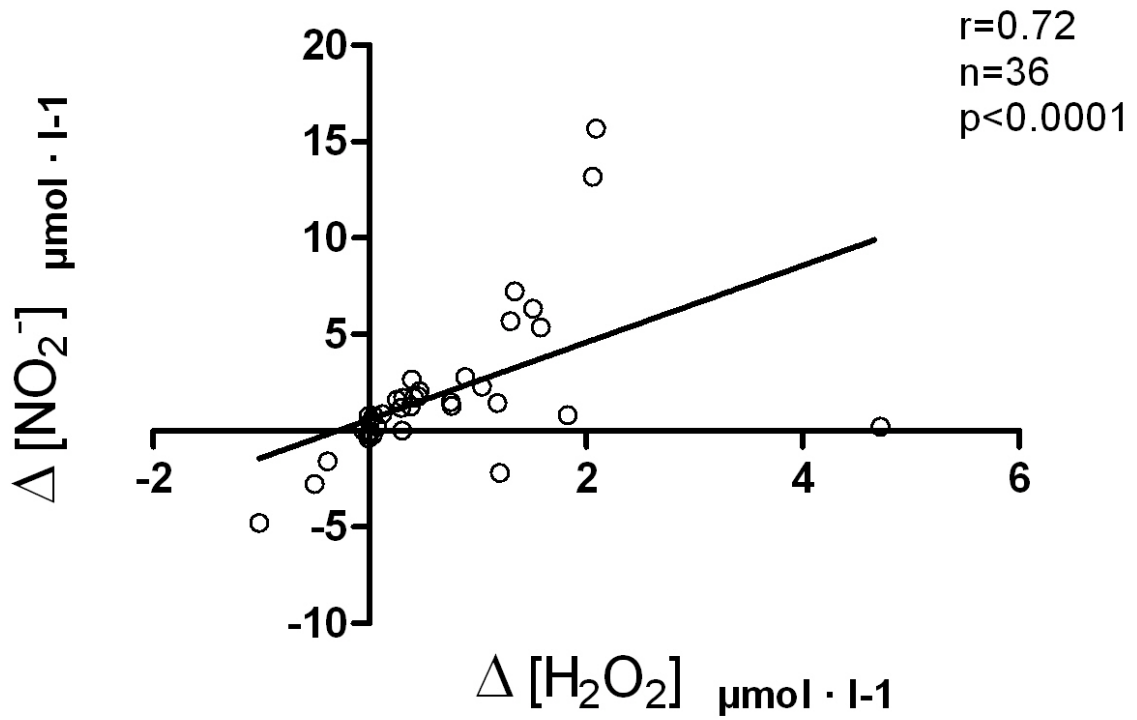


Fig. 5 Relation between absolute changes (20 post-pre) on $[\text{H}_2\text{O}_2]$ versus absolute changes (20 post-pre) $[\text{NO}_2^-]$ in 10, 21 and 42 kilometer runners.

Table 1 Characteristics of competitors on the six races.

	10K	21K	42K
Men/Women	9/3	7/5	12/5
Age (years)	31.5±10.9	36.6±8.6	38.2±8.3
Weight (kilograms)	63.1±5.8	63.4±13.1	65.2±8.6
Height (centimeters)	170.4±5.9	168.0±10.0	169.5±6.4
Training (km/week)	48.3±26.4	50.3±24.4	59.2±18.3
Race time (seconds)	3209±522	6090±880 ^{a, b}	14793±2693 ^a

Values are expressed as average±SD. ^a p< 0.05 different from 10K group. ^b p< 0.05 different from 42K group

Table 2 Number of subjects by distance, environmental variables and air contaminant concentration during the six races.

	Race 1	Race 2	Race 3	Race 4	Race 5	Race 6
10K:21K:42K	0:4:0	0:2:4	5:3:0	0:1:5	2:2:8	5:0:0
Season	Spring	Autumn	Winter	Autumn	Autumn	Spring
Temperature °C	27.4	22.0	14.5	22.0	14.3	15.6
Humidity (%)	83	75	55	44	80	34
O₃ (ppb)	38.8	35.4	10.6	34.8	9.7	30.6
NO₂ (ppb)	16.4	32.0	39.4	23.2	23.1	5.1
CO (ppm)	0.4	0.4	0.4	0.6	0.5	0.2
MP₁₀ (µg/m³)	42.6	57.5	80.8	64.2	85.9	6.6
SO₂ (ppb)	3.2	2.5	no data	4.1	1.5	no data

Data were obtained from MACAM-II air quality network (Santiago of Chile).

Table 3 Race time, concentration and absolute changes of H₂O₂ and NO₂⁻ in EBC from two 10K races.

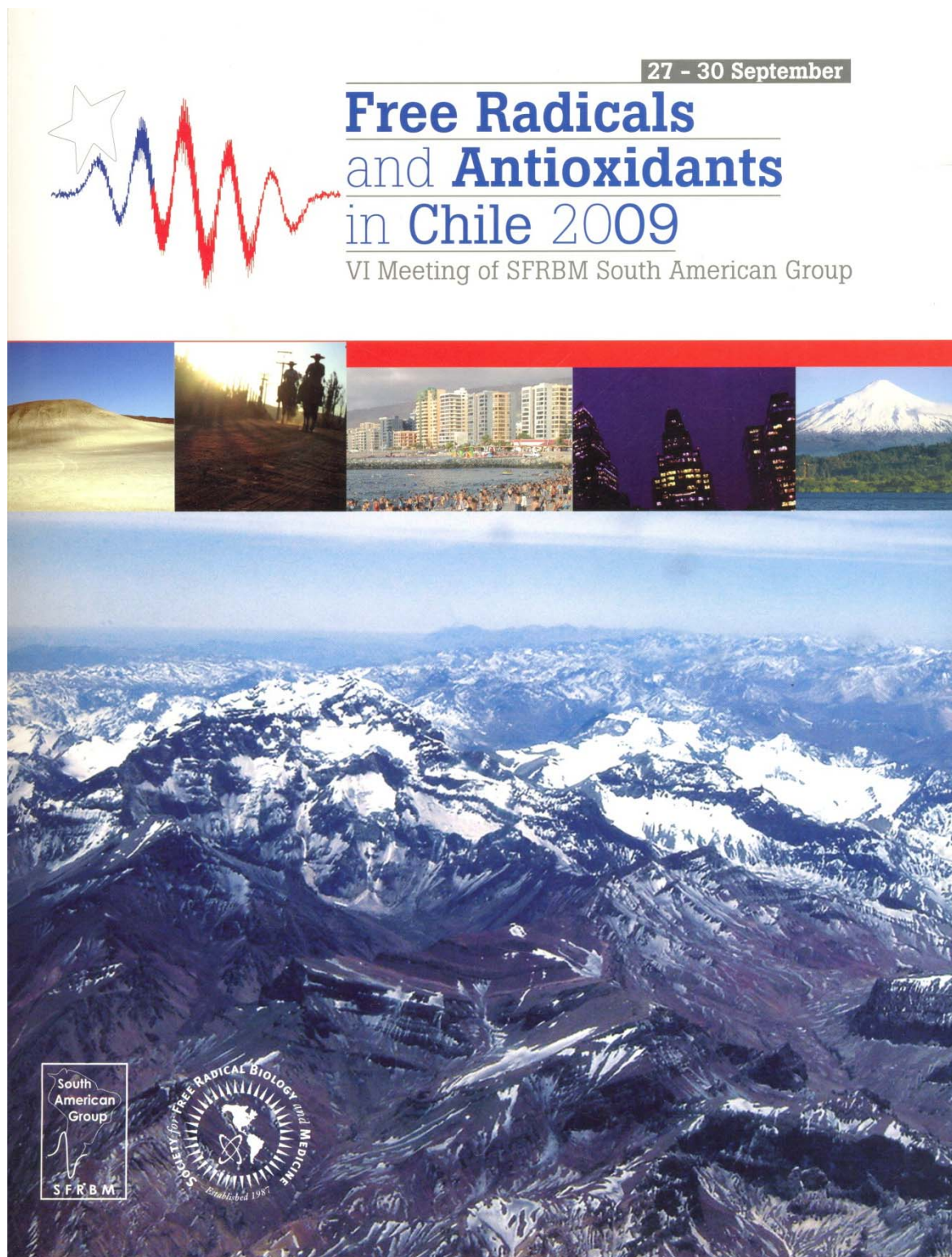
	n	Race time (seconds)	[H ₂ O ₂] (μmol · l ⁻¹)	Δ[H ₂ O ₂] (μmol · l ⁻¹)	[NO ₂ ⁻] (μmol · l ⁻¹)	Δ[NO ₂ ⁻] (μmol · l ⁻¹)
Race 6	5	3024 (2692, 3220)	0.06 (0.00, 0.60)	0.00 (-0.54, 0.16)	0.70 (0.60, 1.00)	0.00 (-2.50, 0.81)
Race 3	5	3409 (2690, 3708)	0.01 (0.00, 0.30)	0.00 (-0.01, 0.17)	1.18 (1.09, 2.65)	0.76 (-0.24, 1.23)
p		0.42	0.67	0.60	0.14	0.54

Deltas were obtained from 20 post-pre. Values are expressed as median and (IQR).

Table 4 Race time, concentration and absolute changes of H₂O₂, NO₂⁻ and pH in EBC from three 42K races.

	n	Race time (seconds)	[H ₂ O ₂] (μmol · l ⁻¹)	Δ[H ₂ O ₂] (μmol · l ⁻¹)	[NO ₂ ⁻] (μmol · l ⁻¹)	Δ[NO ₂ ⁻] (μmol · l ⁻¹)	pH	Δ pH
Race 2	4	14291 (12966,14912)	0.25 (0.00,0.70)	3.17 (1.36,4.67)	0.74 (0.74, 2.18)	0.21 (-2.18, 0.82)	7.10 (5.87, 7.87)	0.09 (-0.28, 0.71)
Race 4	5	11774 (11690,20039)	0.82 (0.21,1.44)	1.34 (-0.10,2.08)	4.71 (1.27, 7.72)	7.24 (-0.52, 14.43)	7.40 (6.10, 7.45)	-1.04 (-2.08, 0.08)
Race 5	8	14666 (13517,15442)	0.54 (0.15,0.81)	1.04 (0.47, 1.46)	2.26 (1.23, 2.75)	2.47 (1.31, 6.18)	7.20 (7.10, 7.50)	-0.27 (-0.51, -0.06)
p		0.68	0.30	0.14	0.13	0.13	0.80	0.17

Nitrite were determined in three participants from race 2. pH were determined in seven participants from race 5. Deltas were obtained from 20 post-pre. Values are expressed as median and (IQR).



RESUMEN

H₂O₂ in exhaled breath condensate (EBC) of long distance runners

Summary. Lung oxidative stress (LOS) occurs in humans exercising at high altitude (Araneda et al., 2005). Whether LOS also occurs by exercise at low altitude (670 m asl) was now examined in endurance runners (5 male and 5 women; 36.2 ± 8.50 y, 169±10.6 cm, 64.7±15.0 kg and VO₂max: 58.9±2.20 ml/kg/min) at the Santiago Marathon 2008, covering either 21.0 km or 42.2 km. EBC was sampled 30 minutes prior to, and 20 min, as well as, 60 min after the race. EBC H₂O₂ concentration, [H₂O₂]_{EBC}, was measured by spectrophotometry (modified FOX₂ method). Statistics included Friedman and Mann-Whitney tests. [H₂O₂]_{EBC} (mean±SD) increased from 0.35±0.29 μM (basal values) to 2.24±1.93 μM at 20 min (p<0.01), and to 2.18±2.57 μM after 60 min (p<0.05), all subjects considered together (n=10). Basal [H₂O₂]_{EBC} was 0.38±0.26 μM and 0.32±0.38 μM in the 21.0 km group (n=6) and the 42.2 km group (n=4), respectively (n.s.). Mean Δ [H₂O₂]_{EBC}, with respect to basal values, was 1.00±1.44 μM and 1.57±1.35 μM, at 20 and 60 min after the race, respectively, in the 21.0 km group. In the 42.2 km group, corresponding Δ [H₂O₂]_{EBC} values were 3.07±1.81 μM and 2.21±3.67 μM. At 20 min after the race, mean Δ [H₂O₂]_{EBC} values of the 21.0 km group were lower than those of the 42.2 km group (p<0.05). At 60 min after the race this difference between both groups was not longer present. Endurance running at low altitude appears to increase LOS, depending on the distance covered.

INTRODUCCIÓN

Con objeto de llevar a cabo el intercambio gaseoso, el tejido pulmonar posee una gran superficie de interfase alveolo-capilar. En su lado alveolar esta membrana se encuentra expuesta a agentes exógenos como gases contaminantes y el humo del cigarrillo. En su lado endotelial toma contacto con células inflamatorias y fármacos. Esta organización estructural implica una gran probabilidad de interacción con potenciales promotores del desequilibrio oxidativo en este órgano, lo que cobra gran importancia en vista que el daño oxidativo ha sido involucrado en la patología de variadas enfermedades respiratorias (tabaquismo, asma, y EPOC). El estudio del equilibrio redox pulmonar se hace difícil en cuanto requiere de la aplicación de métodos invasivos y no exentos de riesgo para los sujetos. En este contexto, se ha difundido el estudio del aire espirado condensado (EBC) como un método alternativo que permite realizar seguimientos en las más diversas situaciones experimentales. Utilizando el análisis del EBC, previamente nuestro grupo reportó un incremento del daño oxidativo pulmonar por ejercicio cuando este fue realizado en condiciones de hipoxia hipobárica (Araneda et al., 2005). En el presente estudio se evaluó el efecto del ejercicio físico prolongado en condiciones de normobaría sobre la generación de pro-oxidantes pulmonares medidos a través de la concentración de H₂O₂ en muestras de EBC obtenidas de corredores aficionados de fondo en competencias de 21 km y 42.2 km.

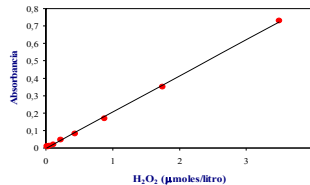
METODOLOGÍA

Sujetos: Diez atletas aficionados, 5 mujeres y 5 hombres (edad: 36,2 ± 8,5 años, estatura: 169,14 ± 10,64 cms, peso: 64,7±15 kgs, y VO₂máximo: 58,9±2,2 ml/kg/min). Todos eran corredores aficionados habituales participantes en pruebas de fondo atlético (21 y 42 km).



Toma de muestras de EBC en corredores de fondo atlético

Obtención de EBC: Fue recolectado utilizando el dispositivo diseñado por OF Araneda (Araneda y Salazar 2009). Las muestras fueron obtenidas durante la Maratón Internacional de Santiago de Chile (2008) entre 7:30 y las 15:00 hrs. Previo lavado bucal con agua destilada y utilizando una pinza nasal este procedimiento se realizó en tres etapas; 30 minutos antes del ejercicio y una vez terminada la prueba a los 20 y 60 minutos. De esta forma, se adquirió un volumen promedio de 1,5 ml, que fue almacenado inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su análisis.



Curva de calibración del método de FOX para la determinación de H₂O₂ en EBC

Peróxido de Hidrógeno: La concentración de H₂O₂ fue analizada mediante el método de FOX modificado (Gay y Gebicki 2002). A 450 µl de EBC se agregó 50µl del reactivo de FOX para incubar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente se determinó la absorbancia a 560 nm (Jenway 6405). Cada una de las muestras se analizó en duplicado y al menos tres curvas de calibración fueron realizadas en cada experimento.

Estadística: Las series fueron analizadas mediante el test de Friedman, utilizando cuando correspondió el test de Dunn's. Las comparaciones entre los grupos de 21 y 42.2 km se efectuaron por medio de la prueba de la U de Mann-Whitney. Los datos se analizaron con el software estadístico Stataplus, 2007.

RESULTADOS

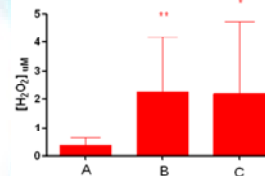


Gráfico 1: [H₂O₂] en EBC en 10 corredores de 21 y 42.2 km. (A: basal, B: 20 min. post carrera y C: 60 min. post carrera). Los datos son presentados como promedio y desviación estándar. *Diferente de los valores basales (p<0.05), **Diferente de los valores basales (p<0.01).

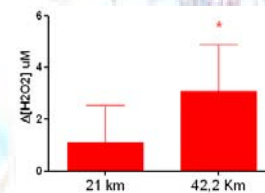


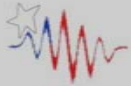
Gráfico 2: Cambios absolutos de la concentración de H₂O₂ (Δ [H₂O₂]) en EBC en corredores de 21 km (n=6) y 42.2 km (n=4). Para calcular Δ [H₂O₂] se utilizó la diferencia entre los 20 minutos post carrera y el valor basal. Los datos son presentados como promedio y desviación estándar. * Diferencia significativa entre los grupos (p<0.05).

CONCLUSIÓN

Se propone al ejercicio físico de larga duración como inductor de pro-oxidantes a nivel pulmonar, además la cantidad de H₂O₂ generado parece relacionada con la distancia recorrida. Es necesario realizar estudios posteriores con objeto de aumentar el tamaño de la muestra para comprobar los fenómenos descritos y complementarlo con análisis de otros marcadores de inflamación y daño oxidativo.

REFERENCIAS

- Araneda OF, García C, Lagos N, Quiroga G, Cajigal J, Salazar MP, Behn C. Lung oxidative stress as related to exercise and altitude. Lipid peroxidation evidence in exhaled breath condensate: a possible predictor of acute mountain sickness. *European Journal of Applied Physiology* 2005 95(5-6):383-90
- Araneda OF, Encina MP. Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate. *J Bras Pneumol*. 2009 ;35(1):69-72.
- Gay CA, Gebicki JM. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal Biochem*. 2002;304(1):42-6.



**Free Radicals
and Antioxidants
in Chile 2009**

VI Meeting of SFRBM South American Group



CERTIFICATE

The Organizing Committee certifies that

Oscar F. Araneda

Presented a Scientific Communication in the

VI Congress of the Society for Free Radical Biology and Medicine, South American Group:

Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009

Santiago, September 27-30, 2009

PROF. FEDERICO LEIGHTON
Conference Co-Chairperson

PROF. EDUARDO LISSI
Conference Chairperson