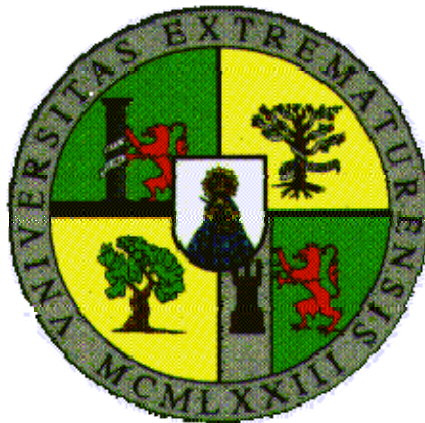


UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL DEPORTE
Departamento de Fisiología



**VALORACIÓN DEL ESFUERZO REALIZADO EN
DISTINTOS TIPOS DE EJERCICIOS MEDIANTE LA
MEDICIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL PERFIL
ESTEROIDEO URINARIO**

**Memoria que presenta Diego Muñoz Marín para optar al grado
de *Doctor en Ciencias del Deporte*.**

20 de julio de 2007

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>



Universidad de Extremadura

Departamento de Fisiología

FACULTAD DE CIENCIAS DEL DEPORTE. Cáceres.

Los Doctores MARCOS MAYNAR MARIÑO, JUAN IGNACIO MAYNAR MARIÑO Y MARIA JESÚS CABALLERO LOSCOS de los Departamentos de Fisiología, Química Analítica y Terapéutica Medico-Quirúrgica, respectivamente, de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICAN:

Que **D. Diego Muñoz Marín**, *Licenciado en Ciencias del Deporte por la Universidad de Extremadura*, ha realizado la Tesis Doctoral “**Valoración del esfuerzo realizado en distintos tipos de ejercicios mediante la medición del estrés oxidativo y el perfil esteroideo urinario**” bajo nuestra dirección y que, a nuestro juicio, reúne las condiciones exigidas para poder optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Cáceres, a 20 de julio de 2007.

Dr. D. Marcos Maynar Mariño

Dr. D Juan I. Maynar Mariño

Dra. Dña. M^a Jesús Caballero Loscos

A mis PADRES Antonio y Caridad

A mis HERMANOS Antonio y Marién

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a la elaboración de esta tesis.

- Al **Prof. Dr. Marcos Maynar**, bajo cuya dirección se ha realizado esta tesis doctoral, por todo el apoyo prestado y formación recibida durante tantos años trabajando gustosamente a su lado, sin el cual no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis.

- Al **Prof. Dr. Juan Ignacio Maynar** y a la **Prof. Dra. María Jesús Caballero** por su tiempo y dedicación como codirectores de esta tesis.

- A **Willy, Pablo, Rafa** y todos los compañeros de laboratorio, por ser grandes amigos y haber hecho tan agradables estos años de trabajo.

- A la **Facultad de Ciencias del Deporte**, al **Departamento de Fisiología** y al de **Química Analítica y Electroquímica** de la Universidad de Extremadura por el uso de su infraestructura y recursos humanos.

- A los **deportistas y demás voluntarios** que prestaron su colaboración como sujetos experimentales de esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	2
1 INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 GENERALIDADES.....	4
1.2 ACTIVIDAD FÍSICA Y ORGANISMOS BIOLÓGICOS.....	5
1.2.1 Ejercicio anaeróbico.....	5
1.2.2 Ejercicio aeróbico.....	6
1.2.3 Radicales libres. Concepto, tipos y fuentes de producción.....	7
1.2.4 Sistemas antioxidantes.....	15
1.2.4.1 Antioxidantes enzimáticos.....	16
1.2.4.2 Antioxidantes no enzimáticos.....	19
1.2.5 Estrés oxidativo.....	23
1.2.6 Actividad física y estrés oxidativo.....	26
1.2.6.1 Actividades de intensidad máxima, estrés oxidativo y respuesta antioxidante.....	26
1.2.6.2 Actividades de intensidad submáxima, estrés oxidativo y respuesta antioxidante.....	29
1.2.7 Respuesta Hormonal ante el ejercicio.....	34
2 OBJETIVOS.....	60
3 MATERIAL Y METODO.....	61
3.1 REACTIVOS.....	61
3.1.1 Reactivos genéricos.....	61
3.1.2 Reactivos para determinación sanguínea de parámetros de estrés oxidativo.....	61
3.1.3 Reactivos para determinación en orina de parámetros de estrés hormonal.....	62
3.1.3.1 Andrógenos y estrógenos:.....	62
3.1.3.2 Corticosteroides.....	63
3.2 INSTRUMENTAL UTILIZADO.....	63
3.3 SUJETOS DE ESTUDIO.....	65
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	67
3.5 VALORACIÓN DEL RENDIMIENTO FISICO.....	69

3.5.1	Prueba de esfuerzo máxima	70
3.5.2	Prueba de esfuerzo submáxima al 75-80% del VO ₂ máximo	71
3.6	VALORACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO	72
3.6.1	Marcadores de estrés oxidativo y peroxidación lipídica	72
3.6.2	Sistemas antioxidantes no enzimáticos	73
3.7	VALORACION DEL PERFIL ESTEROIDEO	75
3.7.1	Determinación de andrógenos y corticosteroides en orina	76
3.7.2	Determinación de creatinina en orina	77
3.8	ANALISIS ESTADÍSTICO	79
4	RESULTADOS	89
4.1	VALORACIÓN DEL RENDIMIENTO FÍSICO	89
4.1.1	Valoración del rendimiento en la prueba máxima	89
4.1.2	Valoración del rendimiento en la prueba de estado estable aeróbica	90
4.2	ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES	95
4.2.1	Hemoconcentración y valoración del lactato	95
4.2.2	Peroxidación lipídica	99
4.2.2.1	Malondialdehído	99
4.2.3	Sistemas antioxidantes no enzimáticos	101
4.2.3.1	Vitamina C	101
4.2.3.2	Vitamina E	104
4.2.3.3	Vitamina A	105
4.3	VALORACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN ORINA	108
4.3.1	Valoración de andrógenos testiculares	109
4.3.2	Valoración de andrógenos suprarrenales	111
4.3.3	Valoración de corticosteroides	113
4.3.4	Valoración de estrógenos	115
4.3.5	Relaciones anabolismo / catabolismo y actividad enzimática	117
5	DISCUSIÓN	140
5.1	VALORACION DEL RENDIMIENTO FÍSICO	140

5.1.1	Valoración de la prueba máxima.....	140
5.1.2	Valoración de la prueba en estado estable.....	140
5.2	VALORACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES.....	142
5.2.1	Hemoconcentración y valoración del lactato y hemoglobina.....	142
5.2.2	Peroxidación lipídica	143
5.2.3	Respuesta antioxidante.....	144
5.3	VALORACIÓN DEL ESTRÉS SOBRE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN ORINA	147
5.3.1	Creatinina.....	147
5.3.2	Andrógenos.....	148
5.3.3	Corticosteroides	150
5.3.4	Relación Anabolismo/catabolismo, actividad 5 α -reductasa y aromatización	151
6	RESUMEN Y CONCLUSIONES	160
7	SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	166
8	BIBLIOGRAFÍA.....	170

ABREVIATURAS

Abreviaturas

μL:	Microclitros
μM:	Micromolar
Ac.:	Ácido
ACTH:	Hormona adreno-cortico-tropa
ATP:	Adenosín - 5' - trifosfato
ATT:	Andrógenos testiculares totales
AST:	Andrógenos suprarrenales totales
CK:	Creatina kinasa
cm:	Centímetros
CO ₂ :	Dióxido de carbono
CT:	Corticosteroides totales
Cu/Zn-SOD:	Cobre/zinc superóxido dismutasa
DHEA:	Hormona dehidroepiandrosterona
DNA:	Ácido desoxiribonucleico
DHT:	Hormona dihidrotestosterona
EC-SOD:	Superóxido dismutasa extracelular
FSH:	Hormona folículoestimulante
GPX:	Glutation peroxidasa
GSH:	Glutation reducido
GSSG:	Glutation oxidado
HPLC:	Cromatografía líquida de alta presión

Htc:	Hematocrito
Hb:	Hemoglobina
L:	Litro
LH:	Hormona luteinizante
M:	Molar
MDA:	Malondialdehido
mL:	Mililitros
mm:	Milímetros
mM:	Milimolar
Mn-SOD:	Manganeso superóxido dismutasa
MSTFA:	N – Methyl – N – (trimethylsilyl) trifluoroacetamide
NADH:	Nicotinamida adenín-dinucleótido reducido
NADPH:	Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido
Nm:	Nanómetros
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
r.p.m:	Revoluciones por minuto
SOD:	Superóxido dismutasa
UV:	Ultravioleta
VO ₂ :	Consumo de oxígeno
XO:	Xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

Tradicionalmente, la práctica deportiva y la capacidad para consumir grandes volúmenes de oxígeno han estado asociadas directamente con un efecto beneficioso para el organismo (Holloszy, 1993; Jenkins, 1993).

Sin embargo, numerosos estudios demuestran que el ejercicio físico es fuente natural de radicales libres de oxígeno (Mena *et al.*, 1991), que son sustancias químicas muy inestables, con una fuerte reactividad y una gran actividad como aceptores de electrones – oxidantes -, lo cual les implica en la producción de daño a diferentes moléculas del organismo (Halliwell, 1994). Durante los últimos años se ha venido observando que los radicales libres, responsables del daño celular y la peroxidación lipídica, son producidos por el propio metabolismo, incluso en estado de reposo (Jenkins, 1993).

La presencia de estas especies reactivas de oxígeno (ROS) es algo natural en los seres vivos. Sin embargo, no sólo es importante la presencia o no de estos radicales libres como parámetro meramente cualitativo, sino que es de especial interés la cantidad en la que se producen.

Cualquier proceso metabólico que implique reacciones del tipo *redox* es, *per se*, una posible fuente continua de producción de radicales libres. Esto permite considerar que cualquier situación de estrés, entre las cuales se incluye la realización de ejercicio físico, implica la posibilidad de una excesiva producción de radicales libres, con todas las consecuencias que esto puede conllevar.

Para hacer frente a esta producción de radicales libres y el consecuente daño celular, el organismo tiene varios mecanismos de defensa, entre lo que podemos destacar dos sistemas: enzimáticos y no enzimáticos.

Cuando la producción de ROS excede la capacidad antioxidante del organismo, se genera un desequilibrio que provoca estrés oxidativo y daño celular.

Por otro lado, el estrés producido por el ejercicio físico, sea cual sea su intensidad va a provocar una serie de respuestas a nivel fisiológico y orgánico a través de mecanis-

mos neuro-endocrino-metabólicos, con el fin de mantener la homeostasis y el equilibrio en el organismo. Este ejercicio físico, modificador del metabolismo hormonal, puede producir una disfunción en el eje hipofisario-hipotalámico con una producción hormonal alterada, como se confirma en una gran cantidad de estudios (Adlercreutz *et al.*, 1986; Luger *et al.*, 1987; Urhausen *et al.*, 1995; Fry *et al.*, 1998)

Parámetros como la intensidad y la duración del ejercicio van a determinar el nivel de activación del sistema endocrino (Ballarin *et al.*, 1986; Kraemer, 1988; Lehmann *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 2001), así como la producción de ROS.

1.2 ACTIVIDAD FÍSICA Y ORGANISMOS BIOLÓGICOS

1.2.1 Ejercicio anaeróbico

Por actividad anaeróbica entendemos aquella donde la principal fuente de producción de energía es mediante metabolismos carentes de oxígeno entre los que se encuentran el metabolismo glucolítico láctico y el metabolismo de los fosfatos de alta energía.

El metabolismo de los fosfatos de alta energía se fundamenta en la ruptura del enlace fosfato de una molécula de fosfato de creatina, liberando una gran cantidad de energía velozmente pudiendo ser aprovechada para el movimiento, con el inconveniente de su rápido agotamiento, cercano a los 6-8 segundos (Wilmore & Costill, 1998).

El metabolismo glucolítico anaeróbico permite la utilización de la glucosa como fuente de energía con una mayor velocidad en la obtención de la misma frente al metabolismo aeróbico, pero por el contrario un menor aporte energético total y una acumulación de ácido láctico como consecuencia de la no participación en la vía aeróbica del ácido pirúvico (Lozano, 2000). En condiciones normales, la mayor parte del lactato se elimina de forma muy eficaz por el hígado, y se utiliza para la neoglucogénesis o para la obtención de energía. Si una alta intensidad de ejercicio es mantenida generará una acidosis metabólica que obligará a una interrupción del ejercicio o disminución en la intensidad de ejecución.

Una manera de cuantificar el ejercicio anaeróbico es mediante el cálculo de la deuda de oxígeno post esfuerzo, sin embargo esta deuda no sólo refleja la activación del

metabolismo anaeróbico durante el esfuerzo sino también la recuperación de otros parámetros relacionados con la actividad física como son termorregulación, eliminación de CO₂, etc, por lo que resultaría de mayor interés el cálculo del déficit de oxígeno al comienzo del esfuerzo (Wilmore & Costill, 1998) como método de cuantificación de la contribución anaeróbica al ejercicio.

No obstante como principal indicador de la activación del metabolismo anaeróbico se puede utilizar el análisis del lactato sanguíneo que con una metodología correcta aporta una gran sensibilidad, sencillez y fiabilidad (Bishop & Martino, 1993).

1.2.2 Ejercicio aeróbico

La palabra aeróbico significa en presencia de oxígeno y por tanto se entiende como ejercicio aeróbico aquella actividad donde la energía consumida proviene predominantemente de la combustión de sustratos metabólicos gracias al oxígeno, entre ellos encontramos las grasas, proteínas y los hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono sufren un proceso glucolítico que da lugar a la transformación de glucosa en piruvato para que éste pueda introducirse en el ciclo de Krebs y posteriormente aprovechar la cadena de transporte de electrones produciendo la energía necesaria para la actividad física con un ratio de resíntesis de 39 moléculas de ATP por cada mol de glucógeno (Lozano, 2000), lo cual le permitirá ser el combustible principal para actividades aeróbicas de alta intensidad.

Las grasas siguen la misma ruta metabólica que los hidratos de carbono a partir del ciclo de Krebs, no obstante es necesario previamente la beta-oxidación de los ácidos grasos, siendo capaces de producir energía necesaria para resintetizar 129 moléculas de ATP por 1 molécula de ácido palmítico, un ácido graso cuya cadena está compuesta por 16 átomos de carbono, obteniendo mayor cantidad de energía a razón de mayor longitud en la cadena carbonada del ácido graso (Galindo, 2000). Así pues, la utilización de las grasas como fuente de energía queda reservada para actividades aeróbicas de larga duración y menor intensidad.

Las proteínas, aunque su función no es primordialmente energética, si pueden participar bajo ciertas circunstancias como combustible metabólico dando lugar a ciertas

transformaciones en algunos aminoácidos que permiten su conversión en glucógeno, proceso conocido como neoglucogénesis (Lozano, 2000).

Así pues una actividad física aeróbica de mayor intensidad requerirá un mayor gasto energético y por tanto un mayor VO_2 que será el reflejo de la capacidad de transporte y utilización del mismo por parte del organismo.

La manera utilizada para cuantificar un ejercicio aeróbico es mediante la valoración del VO_2 , considerándolo de carácter máximo cuando se alcanza la mayor utilización de éste, y submáximo al trabajar a una intensidad relativa referida al máximo alcanzado (Wilmore & Costill, 1998).

1.2.3 Radicales libres. Concepto, tipos y fuentes de producción

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, capaces de existir de forma independiente (Aruoma, 1994), que se producen en todas las células, y que presentan una gran inestabilidad. Son especies muy reactivas y con una elevada actividad como aceptores de electrones, lo cual les convierte en potenciales productores de daño a diferentes moléculas del organismo (Halliwell, 1994).

La alta reactividad de estas especies químicas es debida a los intentos de sus electrones desapareados a buscar una estabilidad mediante la aceptación de otro electrón. Esta reactividad finaliza cuando dos radicales se aparean y forman un “non-radical” ($A^{\bullet} + B^{\bullet} \longrightarrow AB$). Sin embargo, si un radical reacciona con un “non-radical”, se forma un nuevo radical, distinto al anterior ($A^{\bullet} + B \longrightarrow A + B^{\bullet}$) (Cheeseman & Slater, 1993).

En los sistemas biológicos, los radicales libres son habitualmente moléculas de oxígeno, o formadas en parte por éste, lo cual hace que a este conjunto de radicales libres se les denomine en conjunto especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo, existen también radicales libres nitrogenados, o especies reactivas de nitrógeno (RNS).

En muchas ocasiones, los términos de radical libre y ROS, son utilizados para referirse al mismo concepto. Especies reactivas de oxígeno es un concepto que engloba tanto a radicales libres de oxígeno (como puede ser el anión superóxido, radical hidroxilo,

óxido nítrico), así como “non-radical” (reactivos derivados de los radicales libres, como el peróxido de hidrógeno y el ozono) (Halliwell, 1994).

Por otra parte, los radicales libres juegan un papel importante en la homeostasis. Son generados y utilizados por células como los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y los fibroblastos para eliminar organismos extraños como bacterias y virus. Pero el incremento de estos radicales conduce también a un deterioro celular que se presenta de forma muy pronunciada en la vejez, periodo en el que se pueden presentar varias enfermedades asociadas al daño oxidativo.

En la síntesis de prostaglandinas, también se utilizan radicales libres, del mismo modo que en la síntesis del colesterol y las hormonas esteroideas. La hidroxilación de los aminoácidos lisina y prolina a hidroxilisina e hidroxiprolina respectivamente, necesarios para la biosíntesis del colágeno, requiere de la participación del radical libre hidroxilo.

Una vez formados, son capaces de reaccionar con otras biomoléculas cercanas de forma inmediata. Los lípidos representan el grupo más susceptible debido a la presencia de sus dobles enlaces en sus ácidos grasos, además de constituir el organelo celular más expuesto, que es la membrana celular. Esto puede causar daño a las células musculares produciendo un incremento en la fluidez de la membrana, cambios en la estructura proteínica, alteraciones en la actividad enzimática, incapacidad de mantener gradientes iónicos, inflamación celular e inflamación del tejido. En el interior de la célula, atacan al DNA impidiendo a la célula su reproducción.

Las fuentes de producción de radicales libres son diversas pudiendo tener origen exógeno o endógeno. Las fuentes exógenas pueden ser factores ambientales contaminantes, anestésicos o hidrocarburos aromáticos que se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación u otros agentes que ya poseen radicales libres como puede ser el humo del tabaco (Mason, 1982).

Respecto a las fuentes de producción endógenas, como ya hemos comentado anteriormente, podemos destacar la cadena de transporte de electrones, en la que un pequeño porcentaje del oxígeno que entra en ella, no es reducido completamente a agua, sino que se forman ROS (Sjodin *et al.*, 1990; Finkel & Holbrook, 2000), generándose de forma sucesiva el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. La molécula de oxígeno es un “birradical”, es decir, presenta dos electrones desapareados en su

órbita más externa, ambos con el mismo giro paralelo, lo que impide que sea capaz de captar dos electrones de forma simultánea en las reacciones que interviene. Solamente puede aceptar los electrones de uno en uno. La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por la acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, según la siguiente reacción:



Los intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo-oxidasa y no difunden al resto de la célula en condiciones normales, aunque la reducción parcial del oxígeno puede producir estos radicales libres (Reilly & Bulkeley, 1990).

Las estructuras subcelulares de generación de radicales libres incluyen principalmente las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, la citoplásmica y la del retículo endoplásmico. En el caso de los peroxisomas, son organelas ricas en oxidasas y que generan peróxido de hidrógeno, el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua.

Algunos autores consideran que la generación de los radicales libres de oxígeno puede ser producida por una entrada de macrófagos en el músculo y una activación de citokinas durante el ejercicio de alta intensidad (Sacheck & Blumberg, 2001). Las células fagocitarias utilizan el sistema de la NADPH oxidasa para producir directamente anión superóxido, y combatir a bacterias y virus.

Sin embargo, debido a la redistribución sanguínea durante el ejercicio, algunos tejidos pueden permanecer durante algún tiempo en estado de hipoxia durante la contracción muscular, por lo que durante la relajación existe una mayor utilización de oxígeno en el proceso de reperusión y por tanto ser susceptibles de peroxidación (Kanter, 1994; Sacheck & Blumberg, 2001).

Actividades de determinadas enzimas, como la xantina oxidasa (XO) durante el ejercicio parece ser otra fuente de producción de radicales libres, puesto que inhibiendo la actividad de esta enzima han reducido el daño oxidativo producido por el ejercicio (Vina *et al.*, 2000). En la transformación de xantina a ácido úrico, mediante esta enzima, se produce como producto anión superóxido,

También parece ser que a partir de la autooxidación de catecolaminas durante el ejercicio, se pueden producir radicales libres (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1999; Ramel *et al.*, 2004a)

Otro factor que puede influir en la formación de ROS es la producción de ácido láctico, que puede convertir a un radical libre poco dañino (radical superóxido) en otro mucho más perjudicial (perhidroxilo), por la interacción del primero con los protones derivados del ácido láctico.

Existen diferentes tipos de radicales libres, entre los que podemos destacar los siguientes:

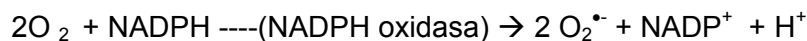
Anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$)

Es un radical libre poco reactivo pero potencialmente tóxico al poder generar otras ROS más tóxicas iniciando nuevas reacciones.



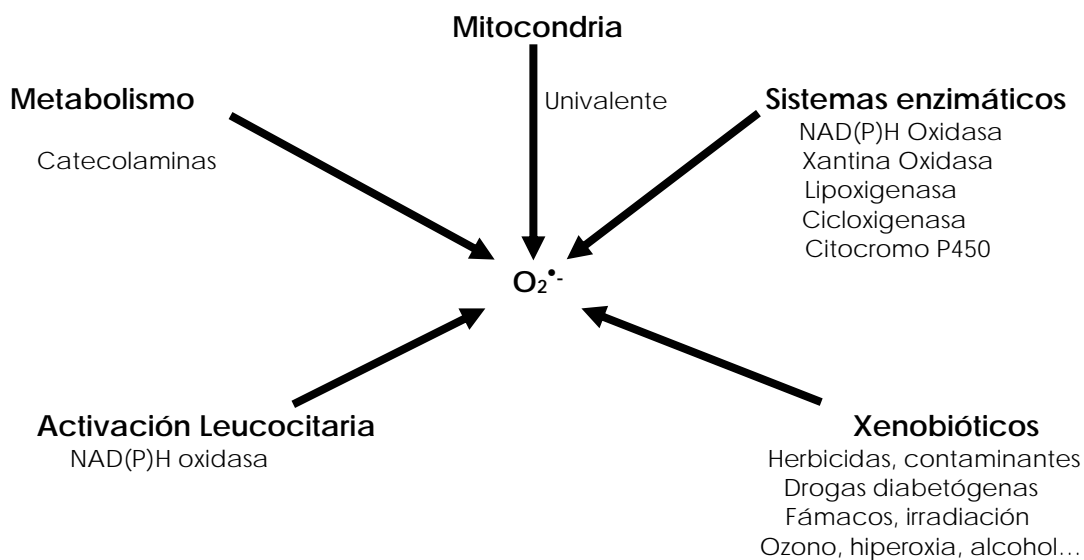
A partir de este radical libre se generan el resto de especies reactivas. Este anión superóxido presenta varias fuentes de producción, entre las que destacamos la cadena de transporte de electrones, complejo I de esta cadena en presencia de NADH y en el complejo III, así como otras enzimas mitocondriales del complejo II, como la glicerol-1-fosfato deshidrogenasa y dehidroorotato deshidrogenasa (Whatley *et al.*, 1998; Lenaz, 2001; Kushnareva *et al.*, 2002). Durante el ejercicio, se estima que de un 2 a un 5% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones, no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa, sino que se forma anión superóxido (Mumby *et al.*, 1999; Finkel & Holbrook, 2000).

También es productora de este anión superóxido la actividad fagocítica, mediante la actividad de la enzima NADPH oxidasa. El anión superóxido formado por la oxidasa NAD(P)H controla la producción de eritropoyetina, participa en el control de la ventilación, en la relajación del músculo liso y en la transducción de señales de varios receptores de membrana que activan funciones inmunes.



Otra fuente de producción del anión superóxido es la XO, en el metabolismo de las purinas, en células endoteliales, miocardio y en diversos tejidos. La XO, utilizando la hipoxantina por un lado y por otro el oxígeno molecular, aportaado en la reperfusión, cataliza la formación del anión superóxido (Koo et al., 1992)

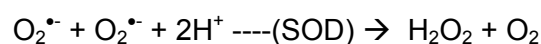
De modo esquemático, la formación del anión superóxido queda representada en la gráfica 1.



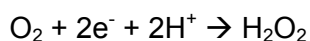
Gráfica 1.- Fuentes de producción del anión superóxido

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Al no presentar ningún electrón desapareado no es considerado como un radical libre en sí, pero presenta gran facilidad para su difusión a través de las membranas. Es considerado como un pro-oxidante. El anión superóxido se puede transformar en peróxido de hidrógeno mediante una dismutación con pH ácido en el fagosoma, o mediante una dismutación enzimática en el citosol, catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD).

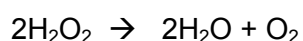


Otra fuente de producción es mediante la adición directa de dos electrones al oxígeno molecular a través de reacciones catalizadas por algunas enzimas.



El peróxido de hidrógeno es un compuesto oxidante relativamente estable y puede atravesar la capa de lípidos de las membranas celulares debido a la ausencia de carga eléctrica de su molécula.

En principio, el peróxido de hidrógeno puede seguir varias vías, una de ellas es su metabolización a agua y oxígeno.



Por otro lado, puede dar lugar, si participa en diferentes reacciones, a radicales libres muy tóxicos como el radical hidroxilo, dotado de una gran capacidad para producir alteraciones tóxicas. Mediante la reacción con metales de transición, tanto libres (Fe^{2+} , Cu^+) como unidos a proteínas, es capaz de transformarse en radicales libres, en una reacción conocida con el nombre de reacción de Fenton.



En presencia de cloro puede dar lugar al ácido hipocloroso (anión hipoclorito). Este ácido hipocloroso es un radical muy tóxico y la especie más reactiva formada por los fagocitos. Su efecto tóxico se ejerce también sobre las células normales pudiendo oxidar lípidos y proteoglicanos de las membranas celulares. Intracelularmente, inhibe los citocromos con lo que impide la cadena respiratoria. Asimismo, el ácido hipocloroso puede reaccionar con radicales NH_2 con lo que forman las cloraminas, oxidante de vida media. Algunos tipos de cloraminas son tóxicas cuando el nivel de amoníaco aumenta en sangre.

Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

Es la especie más reactiva (Liochev & Fridovich, 1994), y se forma por la adición de un electrón al peróxido de hidrógeno, o de tres electrones a la molécula de oxígeno.

Su formación viene derivada de la reacción de Fenton, a partir de la reacción del agua oxigenada y del radical superóxido mediante la reacción de Haber-Weiss:



Esta reacción de Haber- Weiss es muy lenta y puede considerarse como irrelevante, pero se ve incrementada en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Se estima que pasan únicamente nanosegundos desde que se forma hasta que reacciona con los lípidos de las membranas celulares, proteínas, DNA, y a diferencia del peróxido de hidrógeno, no existen sistemas específicos de defensa celular contra el radical hidroxilo. Su reacción con la membrana celular genera la degradación de los ácidos grasos, lo que repercute en la pérdida de integridad de la membrana y, finalmente, en muerte celular.

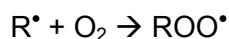
Los ácidos grasos de las membranas celulares son las especies más susceptibles que reaccionan con el radical hidroxilo. Tras algunas transformaciones complejas de las moléculas del ácido graso, se produce una reacción en cadena, denominada lipoperoxidación, en la que se van produciendo cada vez más radicales libres, y que si no es detenida por los agentes antioxidantes de la propia membrana o por agentes externos, puede llegar a producir lesiones de la membrana (North *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994), además de productos de degradación, como el hidroxinonenal o el MDA que, de por sí, tienen propiedades cancerígenas.

Cuando la producción del radical hidroxilo se da cerca de una cadena de DNA, el radical puede reaccionar con la desoxirribosa, transformándola en una gran cantidad de productos diferentes, algunos de los cuales han revelado propiedades mutágenas en algunas bacterias. Además, puede actuar directamente sobre las bases púricas y pirimídicas, en general por adición, por ejemplo, en el doble enlace de la timina, para convertirla en timina-glicol, al que confiere el carácter de radical libre. Este puede reaccionar posteriormente con el oxígeno, para formar peroxitimina, francamente reactiva, que puede unirse a moléculas adyacentes, modificando la estructura de la cadena de DNA.

Radical peroxilo (ROO[•]).

Son los radicales más abundantes en los sistemas biológicos. Se originan a partir de la adición del oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado. Se forman como intermediarios durante la ruptura de los lípidos peroxidados en las reacciones de la

peroxidación lipídica. La formación de ROO^\bullet es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena durante la peroxidación lipídica. La peroxidación de la membrana produce alteraciones de las funciones secretoras y de los gradientes iónicos. Numerosos residuos químicos de estas reacciones pueden difundir del sitio donde se producen y provocar edema, estimular la fosfolipasa A_2 e inducir la liberación de ácido araquidónico con la consiguiente formación de eicosanoides.



Es un radical más fuerte que el anión superóxido, capaz de atravesar las membranas celulares e iniciar la peroxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Halliwell, 1989).

Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

Es una molécula relativamente estable con 6 electrones apareados en su órbita más externa. Es una forma excitada del oxígeno molecular, ante la incidencia de factores como las radiaciones y los rayos UV. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Como resultado, uno de los 6 electrones se estructurará en una nueva órbita, con lo que intentará buscar la estabilidad mediante la aceptación de otro electrón, lo que coincide con la definición de radical.

Se ha observado que esta forma activa del oxígeno (oxígeno singlete), que es iniciadora de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Aruoma *et al.*, 1989), puede también iniciar y/o propagar la oxidación del colesterol (Halliwell, 1994). Se caracteriza por ser un agente electrofílico, capaz de oxidar irreversiblemente proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en sistemas biológicos, produciendo en último término la muerte celular.

Óxido nítrico (NO^\bullet)

Es un gas lipofílico e hidrosoluble, con una vida media de 3 a 5 segundos. Se forma enzimáticamente a partir de la oxidación de la arginina a citrulina 4 en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasas, un grupo de enzimas que, según los casos, pueden ser reguladas por Ca^{++} , o inducibles por citocinas independiente del Ca^{++} , (Moncada & Higgs, 1991). Cuando las concentraciones de NO^\bullet aumentan, éste tiene efectos indirectos

tos a través de sus metabolitos pudiendo reaccionar con el oxígeno o el radical superóxido.

El NO[•] formado puede actuar dentro de la célula en la cual fue generado o difundir a las células adyacentes, regulando las funciones de diferentes células y tejidos de mamíferos sanos, entre las que se incluyen: control de la presión sanguínea, relajación del músculo liso, mantenimiento del tono vascular, inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria, neurotransmisión, neuro-modulación, formación de la memoria y la secreción neuro-endocrina, entre otras. El NO[•] participa, además, en procesos inflamatorios, acción citostática y citotóxica de los macrófagos, muerte de organismos patógenos y de células tumorales (Brown, 1995; Simonian & Coyle, 1996)

Debido a su participación como neurotransmisor, vasodilatador y en el sistema inmunológico, el NO[•] tiene un papel preponderante en la fisiología, patología y farmacología. Se ha investigado exhaustivamente su producción por la mitocondria, observándose que el NO[•] es un importante inhibidor de la citocromo C oxidasa por acción competitiva con esta enzima, afectando la respiración mitocondrial. La inhibición de la respiración mitocondrial, aumenta los niveles tisulares de oxígeno y por lo tanto compite con el NO[•] para limitar una mayor inhibición de la respiración. La inhibición de la respiración por NO[•], aumenta la glicólisis, y por lo tanto puede funcionar como regulador de la provisión de ATP por la glucólisis y la mitocondria (Poderoso et al., 1999).

Otro factor importante a destacar es su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del DNA.

1.2.4 Sistemas antioxidantes

Para hacer frente al ataque de los radicales libres y el consecuente daño celular, el organismo cuenta con una serie de respuestas de defensa denominados "sistemas antioxidantes", cuyo objetivo es mantener el estado de equilibrio que existe entre oxidantes y antioxidantes (Evans & Halliwell, 2001).

Se definen como compuestos que protegen el sistema celular de efectos potencialmente perjudiciales en los procesos que puedan causar una oxidación excesiva (Duthie & Crozier, 2000). Deben estar presentes en el organismo en una concentración suficiente que permita prevenir la acumulación de elementos prooxidantes.

Pueden actuar previniendo la formación de ROS, interceptando el ataque de las mismas, captando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas, incrementando la resistencia al ataque de las especies reactivas en las células diana, facilitando la reparación del daño provocado por los radicales libres y manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Tienen la capacidad de competir con otros sustratos oxidables y por tanto retrasar o inhibir la oxidación de dichos sustratos (Halliwell & Gutteridge, 1985). El antioxidante, al reaccionar con el radical libre, le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico, que en algunos casos, puede volver a su estado inicial mediante la actuación de otros antioxidantes.

Debido a la diversidad en la vida media de los prooxidantes, desde nanosegundos hasta varios segundos, existen diferentes sistemas de defensas para hacerles frente (Sies & Stahl, 1995). De esta forma se han desarrollado varias líneas de defensa, y con distintos objetivos, ya sean de prevención, interceptación o reparación (Sies, 1993).

Los sistemas antioxidantes, según su naturaleza, se enmarcan bajo dos tipos:

1. Sistemas antioxidantes *enzimáticos*
2. Sistemas antioxidantes *no enzimáticos*

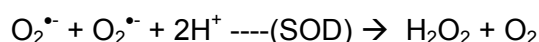
1.2.4.1 Antioxidantes enzimáticos

Son diversas enzimas celulares específicas para la neutralización de las especies reactivas generadas en los procesos *redox* celulares. Su función es la de prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies de oxígeno parcialmente reducidas ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2) (Winston, 1990).

Superóxido dismutasa (SOD)

Enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno (Weiss *et al.*, 1983). Fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich (McCord & Fridovich, 1969), y constituye la primera fase de defensa antioxidante.

El mecanismo de acción de la SOD consiste en dismutar los radicales superóxido, que son altamente tóxicos, convirtiéndolos en oxígeno y peróxido de hidrógeno.



La SOD está presente en cantidades importantes en el interior de la célula, y sin embargo, está ausente en el espacio extracelular y líquidos que la rodean. Ello implica que, mientras la célula está protegida frente a la acción de los radicales libres que se forman en su interior, está expuesta a la acción de los producidos en su entorno.

Se han identificado varias clases de SOD, unida a diferentes metales: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD citosólica y la SOD extracelular (EC-SOD).

La Cu/Zn-SOD, cataliza específicamente la dismutación del anión superóxido a oxígeno y agua. Presenta dos subunidades, y cada una de ellas contiene un centro activo, constituido por iones de cobre y zinc (Mates *et al.*, 1999). La actividad de esta enzima es relativamente independiente del nivel de pH, entre valores de 5-9,5.

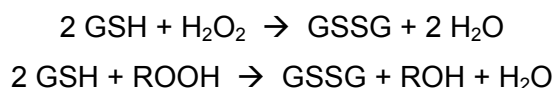
La Mn-SOD mitocondrial, es un tetrámero con cuatro subunidades, y un átomo de manganeso por subunidad. Es uno de los enzimas antioxidantes mas efectivos contra la actividad antitumoral (Behrend *et al.*, 2003). Se encuentra mayoritariamente presente en la matriz mitocondrial, y su presencia en la mitocondria es de gran importancia, pues la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres (Finkel & Holbrook, 2000), de modo que constituye una de las primeras barreras frente al daño oxidativo.

Aunque el contenido de Mn-SOD en tejidos humanos es aproximadamente la mitad del contenido de Cu/Zn-SOD, es esencial para la supervivencia de la vida aerobia y el

desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por las sustancias reactivas de oxígeno.

Glutación peroxidasa (GPX)

Esta enzima reduce el agua oxigenada o el hidroperóxido orgánico a agua y alcohol respectivamente utilizando el glutatión reducido (GSH) como donante de electrones:

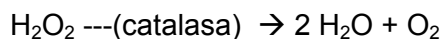


Forma parte de los antioxidantes primarios, convirtiendo los radicales libres en compuestos menos dañinos, o impidiendo su formación. Comparte el sustrato con la catalasa, pudiendo reaccionar de forma efectiva con tejidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) utilizando GSH, contribuyendo a la protección de las células.

Se ubica en el citosol, en la mitocondria y en la membrana celular, lo que la hace ser un mecanismo de protección celular importante contra el daño oxidativo producido a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Ketterer, 1986).

Catalasa

La catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, de la siguiente manera:



Esta enzima se distribuye en toda la célula, hallándose en mayor concentración en los peroxisomas, aunque también se ha encontrado actividad catalasa en mitocondria y citosol (Prasad *et al.*, 1994).

Realiza la misma función que la GPX pero con menor afinidad por el peróxido de hidrógeno. Por ello, a bajas concentraciones, la GPX juega un papel más importante que la catalasa.

1.2.4.2 Antioxidantes no enzimáticos

Además de los antioxidantes enzimáticos, la célula dispone de un conjunto de sistemas no enzimáticos que permiten contrarrestar la acción oxidativa de los radicales libres. Fundamentalmente, los antioxidantes no enzimáticos están constituidos por vitaminas y micronutrientes (Sies & Stahl, 1995). Estos mecanismos deben estar presentes en todos los compartimentos celulares, de ahí que existan antioxidantes hidrosolubles (vitamina C, glutatión) y liposolubles (vitamina E, carotenos).

Glutatión

Constituye el principal antioxidante endógeno de carácter no enzimático. Está constituido por 3 aminoácidos, ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que le otorgan una funcionalidad amplia e importante en la célula. Puede encontrarse en dos formas según su estado de óxidoreducción: como glutatión reducido (GSH), o como glutatión oxidado (GSSG).

El GSH desempeña importantes funciones metabólicas, e interactúa con una amplia gama de radicales libres cediendo un protón (Senturk *et al.*, 2005a). Una de las funciones antioxidantes más importantes del GSH es la eliminación de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos en la reacción catalizada por la GPX descrita con anterioridad. Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la GPX. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria (Eklow *et al.*, 1984).

También está implicado en la reducción de varios antioxidantes celulares, como son el radical de la vitamina E y de la vitamina C (Niki *et al.*, 1995). Puede excretarse de las células y actuar como mecanismo de emergencia frente al daño que un exceso de GSSG puede causar, ya que reacciona con grupos tioles de proteínas formando disulfuros mixtos (Kimura *et al.*, 1989).

La GSH participa en la síntesis de DNA, cuando interviene la glutaredoxina como donante de hidrógeno para reducir los ribonucleótidos a desoxiribonucleótidos. También

está implicado en la regulación de síntesis de proteínas, contribuye a la captación de aminoácidos en algunos tejidos (Vina *et al.*, 1989), constituye un reservorio de cisteína, y modula actividades enzimáticas.

Vitamina E

La vitamina E es el antioxidante más abundante en la naturaleza, encontrándose hasta 8 sustancias que poseen la actividad de la vitamina E: α , β , γ , δ tocoferol, y α , β , γ , δ tocotrienol. Entre ellos destaca el α (alfa) tocoferol por poseer la mayor actividad antioxidante (Burton & Traber, 1990).

Debido a su alta liposolubilidad, la vitamina E se asocia a membranas ricas en lípidos, como la membrana mitocondrial, retículos plasmáticos o la membrana plasmática (Bowles *et al.*, 1991).

La acción antioxidante de la vitamina E se basa en su capacidad para neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipoperoxilo a formas menos reactivas, además de ser capaz de romper la reacción en cadena de lipoperoxidación que ataca a las membranas celulares (Burton & Traber, 1990), siendo probablemente el antioxidante más potente del organismo. Está reconocida como el principal antioxidante en el tejido graso, impidiendo la propagación de los radicales libres (Ricciarelli *et al.*, 2001). De igual manera, en plasma (Burton *et al.*, 1982), y eritrocitos (Burton *et al.*, 1983), la vitamina E es el antioxidante liposoluble que protege a los lípidos del daño peroxidativo.

Al neutralizar la vitamina E a un radical se produce la formación del radical vitamina E, disminuyendo así el contenido celular de ésta. El radical vitamina E se recicla a vitamina E mediante antioxidantes como el glutatión o el ascorbato (Burton & Traber, 1990).

Vitamina A

Es un antioxidante de naturaleza lipofílica, gracias a su corta cadena de polieno que le permite moverse con facilidad en la membrana plasmática combatiendo la peroxidación lipídica, rompiendo el ciclo de ésta interactuando con los radicales peroxilo (Palace *et al.*, 1999). Debido a que el organismo no la puede sintetizar, es necesaria su ingesta mediante la dieta (Palace *et al.*, 1999)

Sus formas activas son el retinol, el retinal y el ácido retiónico, sustancias que se acumulan en el organismo y en altas dosis pueden ser potencialmente tóxicas (Rothman et al., 1995).

Es importante señalar que los efectos antioxidantes de la vitamina A se potencian en presencia de vitamina E, y que este efecto es máximo en una proporción 1:10 (retinol:tocoferol), que es precisamente la proporción que guardan estos compuestos en las membranas de las células biológicas. Este efecto coayudante se atribuye a su protección en diferentes localizaciones físicas, la vitamina E desde la parte exterior de la superficie de las membranas, y la vitamina A desde la interior (Niki *et al.*, 1995; Palace *et al.*, 1999).

Carotenoides

Son antioxidantes liposolubles situados en las membranas celulares. Sus propiedades antioxidantes residen en la estructura de largas cadenas con dobles enlaces conjugados. Por ello pueden neutralizar diversos ROS como el radical superóxido o radicales peroxilo, y el oxígeno singlete (Sundquist *et al.*, 1994; Palozza *et al.*, 1997).

Los carotenoides son capaces de reducir la peroxidación lipídica inducida por radicales libres (Krinsky & Deneke, 1982) y en gran medida son precursores de la vitamina A (Meydani *et al.*, 1993).

Vitamina C

También denominada ácido ascórbico, es un compuesto altamente polar, soluble en agua, e insoluble en medios lipídicos. Está presente en la mayoría de tejidos y es especialmente abundante en el tejido adrenal (Senturk *et al.*, 2005a), siendo considerado como el antioxidante natural menos tóxico.

La vitamina C funciona como agente reductor en reacciones de hidroxilación o reacciones de oxido-reducción, capaz de neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipohidroperóxido, y formando radical semihidroascorbato, que posteriormente es reducido por el ascorbato.

Es considerada como el agente reductor más reactivo que puede ocurrir de forma natural en el tejido vivo, y nutriente esencial para el ser humano, ya que éste no puede sintetizarlo por sí solo (Fennemma, 1996). En solución acuosa, también puede reaccionar con RNS, previniendo la nitración de moléculas diana.

Inhibe la oxidación de lipoproteínas de alta densidad (HDL), permitiendo así que éstas mantengan su capacidad cardioprotectora (Hillstrom *et al.*, 2003). No obstante a altas concentraciones puede tener un efecto pro-oxidante en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre (Frei, 1994).

Este mecanismo pro-oxidante se fundamenta en la capacidad para reducir el hierro férrico a ferroso (reacción de Fenton), cuando la concentración tisular de hierro es elevada, ya que éste es un potente inductor de radicales, especialmente radical hidroxilo mediante la reacción de Haber - Weiss. Por este motivo han sido cuestionada por algunos autores la megadosis de vitamina C (Senturk *et al.*, 2005a).

Debido a que esta vitamina es un ácido, es razonablemente estable en soluciones ácidas, pero en soluciones básicas o neutras es fácil y rápidamente oxidada, perdiendo dos átomos de hidrógeno y convirtiéndose en ácido dihidroascórbico, y posteriormente reciclada a ácido ascórbico por la enzima dihidroascorbato reductasa.

Dentro de las funciones que posee, se encuentra la síntesis de colágeno, síntesis de norepinefrina, síntesis de carnitina, e incluso algunos estudios sugieren que está envuelta en el metabolismo del colesterol a ácidos biliares, lo cual a su vez tiene implicaciones en los niveles de colesterol en sangre (Simon & Hudes, 2000)

Por otro lado actúa como agente fundamental en la regeneración de la vitamina E (Packer *et al.*, 1979; Carr & Frei, 1999).

Ácido α -lipoico

Es un compuesto natural que actúa como cofactor de complejos α -dehidrogenasa y participa en reacciones de transferencia de grupos que contienen azufre. Se encuentra bajas concentraciones en tejidos animales y está unido habitualmente a complejos enzimáticos, por lo que resulta difícil su disponibilidad como antioxidante (Packer, 1994).

El ácido α -lipoico exógeno y libre puede tener un papel importante como antioxidante participando en el reciclaje del ascorbato (Kagan *et al.*, 1992).

Ácido Úrico

El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas hasta su degradación en urea.

Participa en acciones neutralizadoras de radicales hidroxilo, oxígeno singlete, oxidantes oxohemoglobínicos, radicales hidroperóxilos y del ácido hipocloroso (Fischer *et al.*, 1992).

1.2.5 Estrés oxidativo

Las células, para combatir el ataque de los radicales libres, disponen de unos mecanismos de defensa denominados sistemas antioxidantes. Cuando estos sistemas son incapaces de neutralizar las acciones oxidativas se producirá en mayor o menor medida un daño celular (Jenkins, 1993).

A esta incapacidad de actuación de los mecanismos antioxidantes frente a los radicales libres se le denomina **estrés oxidativo**, concepto que propuso Seis H, en 1985, y que lo definía como un “desequilibrio, en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, en comparación con la situación definida como normal (Sies & Cadenas, 1985). El concepto está inspirado en la idea de estrés de H. Selye instalada para el síndrome general de adaptación fisiológica, y en la idea de Gerschman de que tanto la hiperoxia como la disminución de antioxidantes llevan a daño tisular.

El estrés oxidativo marca sus efectos en distintos tejidos, donde resaltamos los daños sobre los lípidos. El mayor efecto producido por los radicales libres en los lípidos es la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados provocando una disfunción en las membranas celulares de las que forman parte (Halliwell & Cross, 1991; Cheeseman & Slater, 1993).

El proceso se inicia mediante el radical hidroxilo, el radical hidroperóxilo y quizá el oxígeno singlete. El radical libre extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena del ácido graso, dejando un electrón no apareado, con lo cual se genera un radical lipídico (Halliwell, 1994). Este radical lipídico sufrirá un reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado, que reacciona con el oxígeno molecular produciendo un radical hidroperóxilo. Este radical puede a su vez extraer un átomo de

hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado para formar un nuevo radical lipídico y un hidroperóxido lipídico. El radical lipídico entonces se combina con otra molécula de oxígeno y dará lugar a una reacción en cadena. De este modo, el ataque por un solo radical libre da lugar a la formación de un gran número de especies activadas, lo cual desemboca en la oxidación de una gran cantidad de sustancias (Halliwell & Cross, 1991; Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell, 1994).

Los hidroperóxidos generados pueden reaccionar con hierro y cobre y formar radicales peroxilo (LOO^\cdot) y alcoxilo (LO^\cdot), que a su vez son capaces de iniciar nuevas reacciones. Por lo tanto, en presencia de estos metales, la reacción en cadena no solo se propaga, sino que también se amplifica.

Los productos finales de la peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, donde resaltamos el malondialdehído (MDA). Muchos de estos aldehídos formados pueden reaccionar rápidamente con componentes celulares, pudiendo causar alteraciones en el DNA, y daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei, 1994). Asimismo, pueden difundir lejos de su origen y ocasionar edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis.

El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga *et al.*, 1994). La cantidad de peróxidos lipídicos que llega a formarse en una membrana biológica está determinada por la cantidad de radicales libres que se originan inicialmente y por la propagación de la peroxidación lipídica. Ciertos componentes de la defensa antioxidante de las células restringen la extensión de esta reacción en cadena, siendo incluso en ocasiones capaces de detenerla completamente.

Las proteínas también constituyen un blanco para las especies reactivas, aunque el efecto sobre ellas es menos intenso que en el caso de los lípidos a causa de una lenta progresión de las reacciones. Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina y la metionina son los que presentan mayor disposición para ser oxidados (Cashmore *et al.*, 1977). El ataque oxidativo a las proteínas puede provocar modificaciones en aminoácidos específicos, fragmentación de la cadena peptídica, agregaciones o entrecruzamientos, alteraciones de la carga eléctrica o incremento

de la susceptibilidad a la proteólisis. También pueden producirse cambios irreversibles que inhiban la función enzimática (Dean *et al.*, 1997; Shacter, 2000).

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman, 1992).

El DNA también es susceptible de daño oxidativo. El oxígeno se adiciona a las bases del DNA formándose radical peroxilo. Las posteriores reacciones de estas especies radicales del DNA dan lugar a un gran número de productos, entre los que destaca la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, utilizado como marcador de peroxidación. Este producto aparece como consecuencia de la modificación oxidativa que se produce a nivel de la guanosina. También el radical hidroxilo es capaz de atacar las desoxirribosas, purinas y pirimidinas, generando numerosos productos (Halliwell & Aruoma, 1991).

Debemos destacar que el daño oxidativo asociado a proteínas y al DNA no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras del DNA puede aumentar la acumulación de daño oxidativo al mismo, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del DNA dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un DNA dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell & Aruoma, 1991; Breen & Murphy, 1995). Así pues, las lesiones oxidativas al DNA parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas al envejecimiento. El DNA dañado es reparado por enzimas que cortan la parte dañada y ésta es eliminada mediante su excreción por orina (Viguie *et al.*, 1993).

Por último, cabe destacar el daño oxidativo producido sobre los glúcidos. Los glúcidos reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilos. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Monboisse *et al.*, 1988) dando lugar a procesos degenerativos.

Para diagnosticar el daño producido por las especies oxidativas, resulta complicado medir sus niveles en fluidos biológicos ya que su vida media es de fracciones de se-

gundo, por este motivo se recurre a la cuantificación de distintos marcadores indirectos entre los que destacan: Malondialdehído (MDA) (Noberasco *et al.*, 1991), como marcador de peroxidación lipídica, incrementos de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Halliwell & Grootveld, 1987), dienos conjugados (Vuorimaa *et al.*, 1999), cociente entre glutatión oxidado y glutatión reducido (GSSG/GSH), como daño producido en el citosol, así como pentano o etano exhalado, o modificaciones en orina del nucleosido 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, como marcador de daño oxidativo en el DNA (Shigenaga *et al.*, 1989).

1.2.6 Actividad física y estrés oxidativo

Como hemos visto, el ejercicio físico incrementa la necesidad del aporte de oxígeno a los tejidos, causando un incremento en la producción de radicales libres. Cuando esta producción de ROS excede la capacidad antioxidante del organismo, se genera un desequilibrio que provoca estrés oxidativo y daño celular.

La intensidad y la duración del ejercicio son factores importantes relacionados con la producción de estos radicales libres. Durante los últimos años se han estudiado los efectos y las diferencias existentes entre ejercicios de máxima intensidad (hasta el agotamiento), y ejercicios de intensidad submáxima de diferente duración, sobre los indicadores de estrés oxidativo y respuesta antioxidante del organismo. En principio, parece ser que a mayor intensidad de esfuerzo, se produce un mayor incremento en los niveles de MDA, como consecuencia de un mayor estrés oxidativo (Alessio *et al.*, 1988), aunque los cambios producidos en éste y otros parámetros, también pueden estar influidos por la duración del esfuerzo. Según otros autores, los niveles de MDA incrementan a partir de una intensidad de un 70% del VO₂ máximo, aunque en periodos cortos de ejercicio (Lovlin *et al.*, 1987).

1.2.6.1 Actividades de intensidad máxima, estrés oxidativo y respuesta antioxidante

Existen un gran número de estudios que evidencian que los radicales libres juegan un papel importante como mediadores del daño muscular e inflamaciones producidas como consecuencia del ejercicio extenuante. Se dice que la generación de radicales

libres de oxígeno se incrementa durante el ejercicio como resultado del aumento en el VO_2 mitocondrial y el mayor flujo de electrones en la cadena de transporte (Alessio, 1993). Muchos estudios revisados muestran incrementos significativos en MDA después de un ejercicio hasta la extenuación y cambios en los niveles plasmáticos de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Dekkers *et al.*, 1996; Ashton *et al.*, 1999).

Periodos de ejercicio intenso están asociados con incrementos en la peroxidación lipídica, provocando aumentos en los niveles de MDA (Weiss *et al.*, 1983; McBride *et al.*, 1998; Satchek & Blumberg, 2001). Existen estudios que muestran como esfuerzos de 30 segundos de duración a máxima intensidad (test de Wingate), ya provocan respuesta antioxidante enzimática en eritrocitos y modificaciones en niveles plasmáticos de MDA (Groussard *et al.*, 2003b; Xiao & Li, 2006).

En un estudio con sujetos de avanzada edad, llevaron a cabo pruebas de esfuerzo hasta el agotamiento, encontrando que los sujetos entrenados presentaban menores niveles de MDA tras el esfuerzo, mayor capacidad total antioxidante, y mayor actividad de GPX que los no entrenados (Fatouros *et al.*, 2004). Igualmente, nadadores jóvenes, tras un periodo de entrenamiento, presentaban mayor actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, catalasa y GPX, mientras que en el grupo control, los niveles de MDA eran más elevados que en el grupo de entrenados (Cavas & Tarhan, 2004). En esta misma línea, esfuerzos agudos hasta la extenuación (test de esfuerzo incremental máximo) en sujetos sedentarios, producían descensos en los niveles de GSH e incrementos en GSSG, recuperando valores normales a los 60 minutos de acabado el esfuerzo (Elokda *et al.*, 2005). De esta forma, parece ser que el entrenamiento incrementa la actividad de los sistemas antioxidantes, con menores niveles de MDA que los sujetos no entrenados, tras la realización de esfuerzos de intensidad elevada (Niess *et al.*, 1996; Cazzola *et al.*, 2003; Metin *et al.*, 2003a; Metin *et al.*, 2003b).

Cabe destacar una investigación llevada a cabo con ciclistas, en la que valoraban, en diferentes esfuerzos, los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos. Las actividades consistían en una prueba de esfuerzo máxima, una submáxima al 80% del VO_2 máximo, y una etapa de ciclismo. El test incremental máximo no producía cambios significativos en las enzimas antioxidantes en eritrocitos, mientras que el submáximo producía un descenso en la catalasa y glutatión reductasa, y un incremento en la actividad de la SOD. Por último, la etapa de ciclismo incrementaba la actividad de la catalasa y la glutatión reductasa eritrocitaria. Estas diferentes respuestas según la activi-

dad física realizada podrían ser explicadas por los efectos del peróxido de hidrógeno y el anión superóxido sobre la actividad de estas enzimas (Tauler *et al.*, 2005).

También existen algunos estudios en animales, destacando una investigación con ratas, en las que se llevaba a cabo un esfuerzo hasta la extenuación observando incrementos en los niveles de SOD, XO, y MDA, que podrían ser debidos, según los autores, a un incremento en la producción de anión superóxido. De la misma forma, encontraron niveles más bajos en catalasa después del ejercicio, posiblemente como consecuencia de la menor formación de peróxido de hidrógeno (Vani *et al.*, 1990).

Con respecto a la respuesta de los sistemas antioxidantes no enzimáticos (vitamina E, C, y A) ante esfuerzos de intensidad máxima, los estudios encontrados no revelan datos esclarecedores, puesto que la mayoría de ellos estudian los efectos de la suplementación de estas vitaminas sobre parámetros de estrés. Podemos encontrar algunos trabajos en los que se observan incrementos en los niveles de vitamina C (Weiss *et al.*, 1983; Santangelo *et al.*, 2003), y descensos en los niveles de vitamina E (Surmen-Gur *et al.*, 1999). Resultados idénticos obtuvieron en un estudio en el que llevaron a cabo pruebas de esfuerzo hasta la extenuación con jugadores de fútbol (Klapcinska *et al.*, 2005).

En otro estudio, donde los sujetos realizaban esfuerzos de máxima intensidad y de 30 segundos de duración (test de Wingate), se observaban incrementos en los niveles plasmáticos de MDA, descensos en ácido úrico y vitamina E, y no encontraron cambios significativos en los niveles de vitamina A (Baker *et al.*, 2004). Sin embargo, en otro estudio con el mismo protocolo (test de Wingate), observaron incrementos plasmáticos en ácido úrico y vitamina C, y descensos en vitamina E y beta carotenos (Groussard *et al.*, 2003a). Estudios realizados en ratas, también mostraban incrementos en los niveles de MDA, aunque se observaban descensos en los niveles de vitamina C, en relación a la duración del ejercicio (Koz *et al.*, 1992).

Por otro lado, Kostka y cols., (1998), llevaron a cabo un estudio en el que intentaban determinar la relación que podía existir entre el VO₂ máximo, estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante en sujetos de avanzada edad, llegando a la conclusión de que existe una relación directa entre los niveles de VO₂ máximo y MDA, mientras que la relación es inversa entre el VO₂ máximo y parámetros antioxidantes, estableciendo que la intensidad del ejercicio puede ser un factor desfavorable relacionado con la actividad saludable (Kostka *et al.*, 1998)

Cabe destacar algunos estudios en los que resaltan un aspecto importante a la hora de determinar los parámetros tras el ejercicio, y es el hecho de la pérdida de volumen plasmático, que lleva a una hemoconcentración en todos los sujetos. Debido a ello, es necesario realizar la corrección con el hematocrito de los parámetros analizados, para no cometer errores en los niveles obtenidos. Entre los resultados derivados de estos estudios, citamos el aumento de lactato, mientras que los niveles de MDA no se modificaron significativamente. Los niveles de vitamina E disminuyeron significativamente tras el ejercicio (Surmen-Gur *et al.*, 1999).

Según algunos autores, existen diferencias en cuanto a la respuesta antioxidante y el efecto de la formación de radicales libres según el grado de entrenamiento. Así, en pruebas de esfuerzo máximas, hasta la extenuación, sujetos sedentarios muestran mayores alteraciones en cuanto a deformación y agregabilidad de glóbulos rojos, que sujetos entrenados. Tras un periodo de suplementación con vitaminas A, E y C, estas modificaciones eran menores, e incluso los niveles de MDA (Senturk *et al.*, 2005b).

Estos mismos autores sugieren que el estrés oxidativo provocado por el ejercicio físico afecta a la fragilidad osmótica de los eritrocitos, la hemólisis, produciendo un incremento en la hemoglobina plasmática y descenso en los niveles de haptoglobulina. Estas modificaciones son más acusadas en sujetos sedentarios que en entrenados (Yalcin *et al.*, 2000; Senturk *et al.*, 2005a).

1.2.6.2 Actividades de intensidad submáxima, estrés oxidativo y respuesta antioxidante

Por otro lado, existen numerosos estudios acerca de la respuesta del organismo ante esfuerzos de intensidad submáxima, es decir, esfuerzos en los que los sujetos no llegaban al agotamiento, aunque en estos trabajos los protocolos utilizados varían de unos a otros, tanto en intensidad como en duración, obteniendo resultados poco concluyentes.

En este sentido, en estudios donde la intensidad de los esfuerzos estaba alrededor del 65% del VO₂ máximo, cercano al umbral aeróbico, ya observaban incrementos en los niveles de MDA (Kanter *et al.*, 1993; Clarkson & Thompson, 2000; Mastaloudis *et al.*,

2001), con duraciones de esfuerzo que variaban de unos pocos minutos a varias horas. Sin embargo, respecto a la respuesta antioxidante del organismo, existe todavía mucha controversia, existiendo resultados contradictorios en gran cantidad de investigaciones.

Así, en un estudio de duración no superior a 20 minutos de esfuerzo, y a un 75% de la intensidad máxima, observaron elevaciones en los niveles de MDA plasmáticos, incrementos en la respuesta de antioxidantes liposolubles, y no encontraron modificaciones en vitamina C (Ramel *et al.*, 2004b). Igualmente, en otro estudio de características similares, observaron incrementos en niveles de MDA tras la realización del esfuerzo, sin encontrar diferencias significativas en cuanto a modificaciones de vitamina E (Viitala *et al.*, 2004).

Respecto a la respuesta de enzimas antioxidantes, tras un esfuerzo de 30 minutos a una intensidad de 75% de VO_2 máximo, se observó un descenso en los niveles de GSH y aumento en los de GSSG (Goldfarb *et al.*, 2005b).

En este sentido, 8 sujetos entrenados llevaron a cabo esfuerzos en tapiz rodante de 30 minutos de duración, con una intensidad de un 65% del VO_2 máximo, uno de ellos sin gradiente, y otro con un 15% de desnivel hacia abajo, encontrando incrementos significativos en los niveles de MDA en la prueba con desnivel (Close *et al.*, 2004). Un estudio de similares características, con ciclistas, en el que realizaban esfuerzos de 30 minutos a una intensidad del 70% del VO_2 , producía incrementos en los niveles de MDA plasmático (Bryant *et al.*, 2003).

Otro trabajo de investigación con mujeres no entrenadas en resistencia, en el que tenían que realizar trabajo excéntrico, mostró resultados que sugerían que este tipo de ejercicio incrementaba los biomarcadores de estrés oxidativo, como el MDA, y GSSG, mientras descendían los niveles de GSH (Goldfarb *et al.*, 2005a). Este mismo autor llevó a cabo otro trabajo, en el que comparaba ejercicio aeróbico (30 minutos a 70% de VO_2 máximo) y ejercicio anaeróbico (trabajo de multisaltos), y no encontraba diferencias significativas entre niveles de MDA, mientras que sí que aparecían cambios en niveles de GSSG y GSH, incrementando el primero y disminuyendo el segundo (Bloomer *et al.*, 2005). Siguiendo esta línea, Dixon *et al.*, realizaron otro trabajo en el que los sujetos, divididos en 2 grupos, “entrenados” y “no entrenados”, llevaban a cabo 3 series de 10 repeticiones máximas, no encontrando diferencias en MDA, antes y después del ejercicio, ni diferencias entre grupos (Dixon *et al.*, 2006). Otra investigación obtuvo los mismos

resultados, en sujetos entrenados anaerómicamente, que realizaban “sprints” y “sentadillas”, no observando diferencias en cuanto a MDA plasmático (Bloomer *et al.*, 2006).

Siguiendo protocolos parecidos, varios autores estudiaron el efecto de 45 minutos de esfuerzo a una intensidad de un 75% del VO₂ máximo, observando incrementos en MDA plasmático, y descensos en niveles de vitamina E (Sacheck *et al.*, 2003).

Un estudio relevante es el realizado con sujetos entrenados en resistencia y en velocidad, comparados con sedentarios. Fueron sometidos a una media maratón y a una prueba de 6 sprints de 150 metros, para determinar las diferentes respuestas del organismo ante estos esfuerzos, teniendo en cuenta sus características fisiológicas y especificidad de las pruebas. En velocistas, encontraron actividades más elevadas en SOD y GPX, y niveles más bajos de actividad de catalasa que en el grupo control. Por otra parte, en el grupo entrenado en resistencia, solo los niveles de actividad de la SOD eran superiores al grupo control, existiendo también niveles más bajos en la actividad catalasa. En todos los grupos observaron incrementos en los niveles de MDA, utilizado como marcador de estrés oxidativo (Marzatico *et al.*, 1997).

En la literatura aparecen investigaciones de mayor duración, tanto en deportistas como en animales. Así, un estudio en caballos, donde realizaban un esfuerzo físico de 53 minutos a una intensidad moderada, mostraba incrementos en marcadores de estrés oxidativo, observado por un aumento en los niveles de hidroperóxidos lipídicos (Kinnunen *et al.*, 2005).

Por otro lado, esfuerzos de 90 minutos de duración a una intensidad de un 70% del VO₂ máximo, en ciclistas, también mostraban incrementos en marcadores de estrés oxidativo (Morillas-Ruiz *et al.*, 2005). En este sentido, estudios de igual duración, mostraban una correlación positiva entre los niveles de MDA y la sección transversal de las fibras tipo I (fibras lentas, rojas), al igual que existía esta misma relación entre el MDA y la capilarización de las fibras tipo II (fibras rápidas, blancas), defendiendo el postulado del incremento en la producción de radicales libres y estrés oxidativo con el aumento del consumo y utilización de oxígeno (Krotkiewski & Brzezinska, 1996).

De igual forma, un estudio realizado en atletas tras llevar a cabo una media maratón, mostraba incrementos significativos en MDA plasmático (Child *et al.*, 2000). Este mismo autor, realizó un estudio similar en atletas entrenados, que llevaron a cabo una

media maratón, con una intensidad de esfuerzo media de un 77,1% de VO₂ máximo, y una duración media de 1 hora y 25 minutos. Se observó un incremento en los niveles plasmáticos de MDA, CK, capacidad total antioxidante y ácido úrico después del esfuerzo, concluyendo que la respuesta antioxidante del organismo ante esta intensidad y duración de esfuerzo es insuficiente para prevenir el estrés oxidativo derivado de la misma (Child *et al.*, 1998). Resultados similares en cuanto a niveles de MDA y CK se obtuvieron en otro estudio de idénticas características, en el que concluyeron que los incrementos en niveles plasmáticos de CK y mioglobina podrían estar relacionados con el daño producido por los radicales libres en las membranas celulares y el incremento en la permeabilidad de éstas, evidenciado por un incremento en MDA, y no debido al daño mecánico muscular producido por los impactos de la carrera (Goodman *et al.*, 1997), tal y como ocurría en un estudio de saltos (6 series de 30 segundos y 2 minutos de recuperación entre series), en el que el incremento en CK, no estaba acompañado del aumento en MDA, por lo que el daño muscular en este caso era más atribuible al impacto mecánico de los saltos (Ortenblad *et al.*, 1997).

En un estudio en ratas, donde llevaban a cabo sesiones de natación de 3 horas de duración, encontraban niveles elevados de MDA tras la realización del esfuerzo, así como descensos en niveles plasmáticos de testosterona y hormona luteinizante (Manna *et al.*, 2004). Aparecen en la bibliografía estudios donde se encontraban incrementos de vitamina C al finalizar el ejercicio (Gleeson *et al.*, 1987; Viguie *et al.*, 1993; Rokitzki *et al.*, 1994; Kaikkonen *et al.*, 1998; Mastaloudis *et al.*, 2001), con duraciones de esfuerzo similares a las anteriores.

En un estudio realizado en atletas para determinar la relación entre ejercicio prolongado, estrés oxidativo, y la capacidad de defensa del sistema antioxidante del organismo, se observaba un aumento en las concentraciones plasmáticas de vitamina A (18%), y vitamina C (34%), aunque no se realizó la corrección con el hematocrito (Duthie *et al.*, 1990).

Por otro lado, en estudios de características similares se encontraban descensos en los niveles de vitamina E tras la realización del esfuerzo (Mastaloudis *et al.*, 2001), mientras que otras investigaciones no encontraban cambios en los niveles de este parámetro (Viguie *et al.*, 1993). En esta misma línea, un grupo de ciclistas que realizaron una etapa de 170 km, con una duración de 4,5 horas, mostraron incrementos en MDA plasmático y eritrocitario, actividad eritrocitaria de la catalasa y glutatión reductasa incremen-

tadas, y descensos en GPX. Los niveles sanguíneos de glutathion oxidasa, ácido úrico y vitamina E aumentaron tras el esfuerzo, volviendo los niveles de vitamina E a su estado basal a las 3 horas de finalizar el esfuerzo (Aguilo *et al.*, 2005; Sureda *et al.*, 2005). En este sentido, un estudio realizado con sujetos entrenados, que completaron una carrera de 80 km de atletismo, a una intensidad media de un 72% del VO₂ máximo, mostró incrementos en los niveles de MDA y CK tras el esfuerzo (Kanter *et al.*, 1988).

En otro estudio realizado en perros, Hinchcliff *et al.*, observaron que tras un ejercicio de intensidad submáxima, la concentración plasmática de vitamina E descendió significativamente después de la carrera (Durocher *et al.*, 2007).

Por otra parte, existen investigaciones donde también se encontraron resultados diversos, no observándose modificaciones en los niveles de vitamina C, E y ácido úrico tras el ejercicio, habiéndose realizado la corrección de los datos con la modificación del hematocrito (Meydani *et al.*, 1993), mientras que en otro estudio con un protocolo similar, se encontraron aumentos en los niveles de vitamina C tras el ejercicio (Gleeson *et al.*, 1987). Estos autores concluyen que es posible que la glándula adrenal pudiera ser la mayor fuente de producción de vitamina C circulante durante el ejercicio, pues se han correlacionado positivamente aumentos de dicha vitamina con incrementos en plasma de cortisol en ratas y humanos. En este sentido, en un estudio realizado en ratas se observó un incremento en vitamina C tras ejercicio y descenso de los niveles de vitamina C en la médula suprarrenal (Umegaki *et al.*, 2000).

Existen investigaciones en las que intentan determinar las adaptaciones de los sistemas antioxidantes con el entrenamiento de resistencia. Así, en un estudio en el que comparaban los niveles de actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos de sujetos sedentarios, deportistas amateurs y profesionales, observaron niveles más elevados de SOD, catalasa y GSH-Px en reposo. Por otro lado, observaron en el grupo de ciclistas, que tras 5 horas ejercicio no existían modificaciones significativas en estas enzimas, aunque tras 20 días de carrera observaban incrementos en la actividad de la SOD y descensos en catalasa (Mena *et al.*, 1991).

En esta misma línea, otros autores estudiaron las modificaciones que se producían tras llevar a cabo un programa de entrenamiento aeróbico (40-50% del VO₂ máximo), durante 9 meses, en mujeres pre y postmenopáusicas, respecto a enzimas antioxidantes enzimáticas en eritrocitos y estrés oxidativo. Tras el programa de entrenamiento, no

observaban cambios en los parámetros de peroxidación lipídica, mientras que existía un incremento significativo en la actividad de la SOD en mujeres postmenopausicas (Hernandez *et al.*, 1999).

Como hemos visto en las investigaciones realizadas, el ejercicio parece incrementar las ROS, produciendo daño a nivel celular. El resultado de ello es el incremento del MDA en sangre y el pentano en respiración. Ambos son indicadores indirectos de peroxidación lipídica. Pero no todos los estudios indican que se produce un aumento en estos parámetros, como consecuencia de la variabilidad individual de respuesta ante las diferentes pruebas a las que han sido sometidos (Clarkson & Thompson, 2000).

1.2.7 Respuesta Hormonal ante el ejercicio

El ejercicio físico, sea cual sea su intensidad, produce una situación de estrés. Esta situación provoca una serie de respuestas a nivel fisiológico y orgánico a través de mecanismos neuro-endocrino-metabólicos, con el fin de mantener la homeostasis y el equilibrio en el organismo. El ejercicio físico y el deporte a más alto nivel, son reconocidos como importantes modificadores del metabolismo hormonal, provocando una disfunción en el eje hipofisario-hipotalámico, con una producción hormonal alterada, como muestran gran cantidad de estudios (Adlercreutz *et al.*, 1986; Luger *et al.*, 1987; Urhansen *et al.*, 1995; Fry *et al.*, 1998).

Este estrés producido por el ejercicio físico, provoca la estimulación del hipotálamo y al mismo tiempo éste activa la hipófisis, que a través de la secreción de hormonas como la hormona adeno-córtico-tropa (ACTH) y las gonadotropinas (FSH y LH), actúan sobre la corteza suprarrenal y los testículos respectivamente, regulando la síntesis de testosterona, DHEA y cortisol (Franchimont *et al.*, 1975). Estas hormonas mantendrán una retroacción negativa sobre la hipófisis (Valloton, 1973).

Esta respuesta endocrina modula la función anabólica/catabólica y por tanto afecta al comportamiento que manifiestan, tanto durante la actividad física como durante la recuperación, hormonas como la testosterona, la hormona de crecimiento, la insulina y el cortisol. En este sentido, cuando el balance es prioritariamente anabólico el músculo incrementa su tamaño (hipertrofia) y puede aumentar los niveles de tensión que es capaz de desarrollar (García Manso, 2001). Así, los andrógenos, y en especial la testosterona, tienen un poderoso efecto anabólico, favoreciendo la síntesis de proteínas en el músculo; mientras que los corticosteroides desempeñan una función eminentemente catabólica.

Los niveles de hormonas esteroideas durante el entrenamiento, la competición o la recuperación responden a las cargas de trabajo utilizadas. La intensidad, duración, volumen y tiempo de recuperación entre series determina el nivel de activación del sistema endocrino (Ballarin *et al.*, 1986; Kraemer, 1988; Lehmann *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 2001).

En la bibliografía existen gran cantidad de estudios acerca de los efectos que el ejercicio físico agudo tiene sobre las concentraciones sanguíneas de las hormonas esteroideas.

Los resultados obtenidos en 18 atletas que acababan de finalizar una maratón mostraban incrementos en las concentraciones plasmáticas de testosterona libre (andrógeno gonadal), cortisol y DHEA (esteroides suprarrenales) (Ponjee *et al.*, 1994; Child *et al.*, 1998). Igualmente, tras una competición de judo los niveles de testosterona y cortisol aparecían elevados de forma significativa (Suay *et al.*, 1999). Estudios más recientes en judocas, sometidos a esfuerzos incrementales hasta el agotamiento, han observado descensos en los niveles urinarios de eticolanolona y epitestosterona (Pucsok *et al.*, 2005), mientras que otros estudios muestran elevaciones en los niveles de cortisol tras esfuerzos intensos y no encontraron cambios en los niveles de DHEA (Minetto *et al.*, 2007).

En este sentido, encontramos estudios que indican elevaciones plasmáticas de testosterona y DHEAS, tras esfuerzos de carácter aeróbico, mientras que los niveles plasmáticos de cortisol solo incrementaban a partir de las 2 horas de esfuerzo. Encontraban también incrementos en las relaciones de hormonas anabólicas y catabólicas en esfuerzos de 40 minutos, mientras que estas relaciones se veían disminuídas en periodos más largos de esfuerzo (Tremblay *et al.*, 2005). Anteriormente, otros autores encontraron incrementos en niveles de testosterona plasmática con esfuerzos de alta intensidad, y no así en esfuerzos submáximos de mayor volumen (Duclos *et al.*, 1996).

Por otro lado, la concentración basal sérica de andrógenos no necesariamente varía durante el entrenamiento normal e incluso puede aparecer por debajo de los valores iniciales previos al trabajo (Hakkinen *et al.*, 1988; Craig *et al.*, 1989). En un grupo de sprinters de élite se observó que los niveles en sangre venosa de testosterona, cortisol y LH habían descendido después de una sesión de fuerza (Bosco *et al.*, 2000a). En otro

estudio en el que se llevaron a cabo dos sesiones de resistencia (65 minutos al 75% del VO_2 máximo) en el mismo día, una por la mañana y otra por la tarde, se observó que, después de la segunda sesión, los niveles de testosterona habían descendido y los de ACTH, cortisol y hormona de crecimiento eran más elevados respecto a los niveles basales (Ronsen *et al.*, 2001). En esta misma línea, en un estudio donde se realizaban series de resistencia a alta intensidad (14 series de 60 segundos movilizando cargas elevadas, con recuperaciones de 1 minuto), no encontraron cambios significativos en las concentraciones de testosterona, LH, FSH y cortisol (Vuorimaa *et al.*, 1999).

Tras una carrera de larga duración e intensidad elevada (45 minutos, a una velocidad de 3,3 min/km), se observó que los niveles de cortisol y androstenodiona incrementaron significativamente y no así los de testosterona. Sin embargo, media hora después de finalizado el esfuerzo se observó un descenso significativo de la testosterona y de la LH plasmática, recuperando los niveles basales pasadas las tres horas. Esto sugiere que la actividad pituitaria adreno-cortical parece indicar el esfuerzo desarrollado durante el ejercicio y el sistema pituitario-testicular parece estar más comprometido en la fase de recuperación (Kuoppasalmi *et al.*, 1980).

Todo esto se ve corroborado por el hecho de que los niveles sanguíneos de testosterona en sujetos entrenados son menores que los de sujetos no entrenados tras la realización de un mismo ejercicio (McColl *et al.*, 1989; Hackney *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 2000).

Esta controversia puede entenderse y encuadrarse en la hipótesis que defienden algunos autores (Weiss *et al.*, 1983; Kraemer *et al.*, 1990; Hakkinen & Pakarinen, 1993; Schwab *et al.*, 1993), de que la respuesta hormonal, y más concretamente las modificaciones en testosterona plasmática (total y libre), sólo se producen si las cargas utilizadas en la misma son lo suficientemente elevadas.

En el caso del cortisol, parece ser que la actividad deportiva incrementa los niveles de ACTH y, como consecuencia de ello, se produce una elevación en el cortisol plasmático (Newmark *et al.*, 1976; Farrell *et al.*, 1987; Petraglia *et al.*, 1988; Bosco *et al.*, 1996; Nindl *et al.*, 2001), urinario (Boudou *et al.*, 1987; Gatti *et al.*, 2005; Makras *et al.*, 2005) e incluso en saliva (Filaire *et al.*, 2001). Sin embargo, en otros estudios (Hackney & Viru, 1999; Bosco *et al.*, 2000b), se observa un descenso en los niveles plasmáticos de cortisol, tras una sola sesión o tras dos sesiones de ejercicio en un día. Algunos autores

defienden que esto podría ser consecuencia de una mayor tasa de aclaramiento con respecto a la tasa de secreción (Few, 1974; Cashmore *et al.*, 1977).

Otro estudio determinaba incrementos en los niveles de cortisol y cortisona urinarios tras la realización de una etapa ciclista. Sin embargo, al realizar la corrección de los datos con los niveles de creatinina urinaria, no encontraban modificaciones estadísticamente significativas tras la actividad (Gatti *et al.*, 2005).

Los estudios en sangre relacionados con sujetos entrenados, presentan algunas contradicciones en cuanto a las variaciones del perfil esteroideo.

El ejercicio físico exhaustivo puede producir descensos significativos en los niveles de testosterona en plasma (Hakkinen, 1989; Hakkinen & Pakarinen, 1991), encontrándose disminuida la capacidad secretora del testículo durante el periodo de recuperación (Kujala *et al.*, 1990). Se observó en un grupo de atletas que corrieron 1100 kilómetros en 20 días, descensos en los niveles sanguíneos de testosterona (Schurmeyer *et al.*, 1984), mientras que otro grupo que corrió 400 km en 15 días, presentaba también descensos en los niveles plasmáticos de testosterona y un incremento en el ratio cortisol/testosterona (Dressendorfer & Wade, 1991).

Por otro lado, en un estudio en el que se doblaba el volumen de entrenamiento durante un periodo de 11 días, se observaron descensos en los niveles de testosterona total y libre, mientras que los niveles de cortisol y LH no mostraron cambios significativos (Flynn *et al.*, 1997). En otro estudio, tras un periodo de 6 semanas de entrenamiento de fuerza se observaba como los niveles plasmáticos de testosterona descendían y los de LH se incrementaban (Busso *et al.*, 1992). Estos niveles plasmáticos de testosterona disminuidos también se han encontrado en maratonianos, levantadores de peso y luchadores (Strauss *et al.*, 1985; Hackney *et al.*, 1989; Wheeler *et al.*, 1991).

Sin embargo, otros estudios han mostrado que no se producen modificaciones significativas en los niveles de testosterona tras un periodo de entrenamiento, ya sea de fuerza o de resistencia combinada con fuerza (Brown *et al.*, 2000; Hakkinen *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2001).

También existen algunos estudios que observan niveles plasmáticos de testosterona libre y total elevados tras periodos de entrenamiento. En muestras sanguíneas de

hombres y mujeres que prepararon una maratón durante 18-20 meses se observaba un incremento de los niveles de testosterona y cortisol (Keizer *et al.*, 1989).

Por otro lado, un estudio donde los sujetos llevaron a cabo un entrenamiento de 10 semanas se observó, como durante las primeras cinco semanas aparecían incrementos en los niveles de testosterona y cortisol, y en las cinco siguientes los niveles de testosterona caían en un 19% (Mero *et al.*, 1997).

En otro estudio de 10 semanas, con jóvenes y personas mayores, se observaron incrementos en los niveles de testosterona libre y total, en ambos grupos, a lo largo del proceso del entrenamiento. En las personas mayores descendió el cortisol de forma significativa al final del periodo (Kraemer *et al.*, 1990).

Como hemos comprobado, tampoco hay unanimidad respecto a las variaciones en las concentraciones de cortisol. Así, unos encuentran niveles elevados tras un periodo de entrenamiento (Dressendorfer & Wade, 1991; Mero *et al.*, 1997) y otros descensos en los mismos (Fry *et al.*, 1998; Hedelin *et al.*, 2000), e incluso existen algunos autores que no encuentran cambios significativos (Flynn *et al.*, 1997). Otros estudios (Lucia *et al.*, 2001; Viru *et al.*, 2001) ponen de manifiesto que el ejercicio intenso y prolongado puede provocar fatiga, un descenso y una disfunción en la actividad del eje pituitario-adrenocortical, con lo que todas las hormonas de origen suprarrenal podrían aparecer disminuidas.

Dada las variaciones que existen entre unos estudios y otros, es preciso profundizar más en la respuesta hormonal tras el ejercicio para poder determinar el grado de estrés producido, según sea la intensidad y la duración del mismo. No obstante, siempre habrá que tener en cuenta las diferencias individuales (Uusitalo *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000).

Hasta ahora, en la mayoría de los estudios, las concentraciones de hormonas esteroideas (andrógenos y corticosteroides) se han venido estudiando en muestras de sangre, aunque en algunas ocasiones se han analizado en orina y saliva, lo que puede dar diferentes resultados. Otros biomarcadores, diferentes a la testosterona, cortisol y su relación, se vienen estudiando para valorar la carga de trabajo o el estrés provocado por el ejercicio físico.

Algunos trabajos plantean que la relación testosterona/cortisol no es muy válida puesto que la activación y las funciones de los sistemas pituitario-adrenal y pituitario testicular no son iguales (Kuoppasalmi *et al.*, 1980; Pantaleoni *et al.*, 1991). Por ello se vienen estudiando otro tipo de biomarcadores como son la Dehidroepiandrosterona y su sulfato (DHEAS), de origen suprarrenal (Keizer *et al.*, 1989; Nishikaze & Furuya, 1998; Filaire & Lac, 2000; Nishikaze & Furuya, 2000), y/o los metabolitos 17-cetoesteroides (androsterona y etiolanolona) y los 17-hidroxicorticosteroides (Tetrahydrocortisol y Tetrahydrocortisona) (Kimura *et al.*, 1989; Fischer *et al.*, 1992), determinando sus concentraciones en orina a través de técnicas cromatográficas (Yap *et al.*, 1996; Ueki & Okano, 1999).

En este sentido, se observó como tras dieciséis semanas de entrenamiento progresivo con jugadoras de balonmano y voleibol, los niveles salivares de DHEA incrementaron. También se utilizó la relación DHEA/cortisol para valorar la carga del entrenamiento y se observaron incrementos en este índice en todas las deportistas. DHEA/cortisol podría ser utilizado como un indicador para valorar la intensidad y la carga de entrenamiento (Filaire *et al.*, 1998).

En otras investigaciones, donde se llevaban a cabo esfuerzos agudos, se observaron como los niveles de DHEA y DHEAS se incrementaron tras la realización de una maratón (Ponjee *et al.*, 1994), de una sesión intensa de gimnasia deportiva (Jahreis *et al.*, 1991), de una actividad física prolongada (Pantaleoni *et al.*, 1991) o tras un partido de hockey hielo (Tegelman *et al.*, 1990).

En este sentido, encontramos estudios que indican incrementos en los niveles de cortisol plasmático tras la realización de esfuerzos incrementales en laboratorio, relacionando estos incrementos con la intensidad del ejercicio, y más concretamente, con los niveles de lactato sanguíneo (Stupnicki *et al.*, 1995).

No obstante, también aparecen algunas investigaciones en las que los niveles de estas hormonas han permanecido igual o han descendido tras la realización de un determinado programa de entrenamiento o de una actividad concreta. Así por ejemplo, tras seis meses de entrenamiento con un grupo de hombres y mujeres, mayores y de mediana edad, se observó que los niveles de DHEA y DHEAS no cambiaron (Hakkinen *et al.*, 2000). Otro estudio en el que se doblaba el volumen de entrenamiento durante 11 días,

provocó un descenso de la dehidroepiandrosterona a lo largo de los días (Flynn *et al.*, 1997).

Otros autores estudiaron el efecto crónico que el entrenamiento provocaba sobre el perfil esteroideo (andrógenos), comparándolo con las modificaciones que se producían tras la competición, obteniendo niveles androgénicos más bajos durante el entrenamiento, mientras que estos parámetros incrementaban tras la competición. Concluyeron que la actividad física podría tener influencia sobre la eliminación de hormonas androgénicas en orina (Maynar *et al.*, 1994).

Otro estudio trató de analizar las variaciones que se producían en el perfil esteroideo urinario (andrógenos, estrógenos y corticosteroides) como consecuencia de la realización de una sesión de ejercicios de fuerza y tras un programa de entrenamiento de fuerza de cuatro semanas de duración, observando que tras la realización de una sesión de ejercicio, ya fuera antes del programa de entrenamiento o después del mismo, disminuía la excreción urinaria de andrógenos, de 17-cetoesteroides (17KS) y de estrógenos. Sin embargo, no observaron diferencias significativas en la excreción de tetrahydrocortisol y tetrahydrocortisona (17-OHCS). La relación 17KS/17OHCS también disminuyó después de la sesión aguda. Tras cuatro semanas de entrenamiento se observó una mejora significativa en la fuerza de los grupos musculares estudiados y un aumento en la excreción urinaria de todas las hormonas androgénicas con respecto al reposo inicial. Los estrógenos y los 17-OHCS no experimentaron cambios significativos, pero la relación 17KS/17OHCS aumentó de forma muy significativa con respecto al reposo inicial. Concluyeron que los sujetos hicieron una adaptación al entrenamiento, mejorando sus niveles de fuerza sin caer en un estado de fatiga crónica (Timon Andrada *et al.*, 2007).

En animales también existen algunos estudios, que indican incrementos en la excreción urinaria de cortisol, tras realizar ejercicios de gran volumen, desde 160 a 560 km de carrera (Durocher *et al.*, 2007)

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

A raíz de la revisión bibliográfica acerca de la situación científica actual relacionada con la respuesta del organismo al ejercicio físico, tanto a nivel de daño celular como de modificaciones hormonales, la presente tesis tiene como objetivo general:

- “determinar las modificaciones que se producen en cuanto a la producción de radicales libres, respuesta antioxidante del organismo, y las modificaciones en las hormonas esteroideas urinarias como consecuencia de la realización de actividad física de diferente intensidad, y establecer un modelo de estrés, analizando estas modificaciones en plasma, eritrocitos y orina”.

Este objetivo general lo concretamos en los siguientes objetivos más específicos:

- Valorar el estrés oxidativo y la respuesta antioxidante no enzimática del organismo bajo diferentes tipos de ejercicio físico, en plasma y eritrocitos.
- Determinar y analizar en orina mediante cromatografía GC/MS y GC/MS/MS la variación en el perfil esteroideo (andrógenos, corticosteroides y estrógenos), derivadas de la realización de actividad física, como marcador de intensidad de esfuerzo.
- Establecer diferencias entre sujetos sedentarios y deportistas, en cuanto a la respuesta del organismo ante el estrés provocado por el ejercicio físico a diferentes intensidades de esfuerzo.

MATERIAL Y MÉTODO

3 MATERIAL Y METODO

3.1 REACTIVOS

A continuación detallamos los reactivos utilizados, conjuntamente a su proveedor. Diferenciaremos los reactivos utilizados de forma genérica para las determinaciones, aquellos utilizados para las determinaciones en sangre de los parámetros de estrés oxidativo, y por último, los utilizados para la determinación en orina de los parámetros hormonales.

3.1.1 Reactivos genéricos

- Agua destilada. Mili Q.
- Nitrógeno gas. Air liquide.
- Helio. Airliquide.
- Metanol. Scharlab.
- Ácido Clorhídrico. Panreac

3.1.2 Reactivos para determinación sanguínea de parámetros de estrés oxidativo

- Ac. Ascórbico. Sigma.
- Ac. Heptadecanoico. Sigma.
- Ac. Metafosfórico. Sigma.
- Ac. Perclórico. Sigma.
- Ac. Sulfúrico. Panreac.
- Ac. Tiobarbitúrico. Sigma.
- Ac. Tricloroacético. Panreac.
- Acetato de alfa-tocoferol. Sigma.
- Acetil clorhído. Sigma.
- Acetonitrilo. Tecknocroma.
- Benceno. Panreac.
- BHT (2,6-di-terr-butyl, 4-metil fenol). Sigma.
- Carbonato potásico. Sigma.

- Triclorometano. Panreac.
- Diclorometano. Panreac.
- Etanol. Panreac.
- Lactato (kit de sigma).
- Malondialdehido (bisdimetil acetal). Sigma.
- n – Hexano. Tecknocroma.

3.1.3 Reactivos para determinación en orina de parámetros de estrés hormonal

- Ac. Acético.
- Arilsulfatasa
- Carbonato potásico (Ph 9-10). Sigma.
- Ditioeritritiol. Sigma.
- Eter dietílico. Panreac.
- Fosfato de sodio (Ph 7). Sigma.
- Kit Creatinina 555-A. Sigma.
- Metoxiamina. Sigma.
- MSTFA. Sigma.
- Piridina. Acros.
- TMS imidazol. Sigma.
- Yoduro Amónico. Panreac.

3.1.3.1 Andrógenos y estrógenos:

Todos los patrones han sido suministrados por la casa Sigma Aldrich.

- Androstenodiona.
- Androsterona.
- β – estradiol.
- Dehidroepiandrosterona (DHEA).
- Epitestosterona.
- Estrona.
- Etiocolanolona.
- Metiltestosterona (P.I).
- Testosterona.

3.1.3.2 *Corticosteroides*

Los patrones utilizados han sido suministrados por la casa Sigma Aldrich.

- Tetrahydrocortisol.
- Tetrahydrocortisona.

3.2 **INSTRUMENTAL UTILIZADO**

El instrumental utilizado detallado a continuación pertenece al Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias del Deporte y al Departamento de Química Analítica y Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura.

INSTRUMENTAL

- Agitador. P-selecta.
- Analizador de gases nº 762014-102. MGC.
- Balanza de precisión. ADA 120/L.
- Baño calentador. Raypa.
- Báscula de pesaje y tallímetro. SECA.
- Centrifugadora meditronic. P-Selecta.
- Cicloergómetro Ergo-metrics 900. Ergoline.
- Columna C18 de 15 cm x4.7 mm.
- Columna capilar SGE-BPX70 de m. x I.D. mm. X 0,25 m Film.
- Columna Facer TRB-1. Teknokroma.
- Columna HPLC Brownlee OD-MP de 10 cm x 4,6 mm.
- Columna HP-1. Agilent Technology Spain.
- Compresor de goma.
- Congelador. Lynx.
- Cromatógrafo de gases HP 5890 SERIES II sistema GC / MS. Hewlett Packard.
- Dispensador de agua ml Q.
- Electrocardiógrafo. Cardioline.
- Esfingomanómetro. Holtain
- Espectrofotómetro. UNICAM 5625.
- Estufa y termobloque. P-Selecta.

- Fonendoscopio. Holtain.
- Gradillas portatubos.
- HPLC. Spectra Series P 100.
- Interface para pulsómetro. POLAR.
- Microcentrifugadora Biofuge *pico*. Heraeus.
- Microcentrifugadora. Alresa.
- Paquímetro. Holtain.
- PC Pentium IV. Software Windows XP.
- Periféricos informáticos. Hewlett Packard.
- Ph – metro. Crison.
- Pipetas Gilson 100 µl.
- Pipetas Gilson 5000 µl.
- Pipetas Wiley 1000 µl.
- Plicómetro. Holtain.
- Probetas 100-500-1000 ml.
- Pulsómetros Vantage NV y S 720 i. POLAR.
- Rotavapor y/o bombonas de nitrógeno (Air Liquide).
- Software POLAR Precision Performance para pulsómetros.
- Termobloque. P-Selecta.
- Termómetro y medidor de humedad modelo Huger. HomFor.
- Tiras colorométricas de pH y densidad. Panreac
- Varian 3800 con detector Saturn 2000 (sistema GC/MS/MS) con inyector automático modelo 8200.
- Vórtex. Heidolph. Reax.

A continuación presentamos el material fungible utilizado, que ha sido suministrado por Scharlab y VIMA, suministros médicos.

MATERIAL FUNGIBLE

- Parafilm.
- Algodón.
- Cubetas para espectrofotómetro.
- Tubos de ensayo cristal 10 ml.
- Tubos de ensayo plástico 10 ml.
- Tubos de ensayo plástico 5 ml.

- Tubos de ensayo cristal con tapón de rosca 10 ml.
- Guantes de látex.
- Puntas de plástico para pipetas.
- Colector de orina 100 ml.
- Tubos extracción de sangre 10 ml LH Vacutainer.
- Sistema extractor de sangre Vacutainer.
- Gasas esterilizadas.
- Esparadrapo.
- Tubos eppendorf 1 ml.
- Capilares 25 μ l Na –Hp.
- Palomillas Vacutainer 23 G.
- Pipetas tipo Pasteur.
- Chupete extractor para pipetas Pasteur.

3.3 SUJETOS DE ESTUDIO

La muestra participante en el estudio se compone de un total de 40 sujetos experimentales. Todos eran varones, no fumadores, y no presentaban ningún problema de salud. El grupo total fue dividido en dos subgrupos bajo el criterio de actividad física realizada y nivel de condición física.

- a) **Grupo de sujetos *no entrenados* (n = 20):** formado por sujetos que realizaban práctica deportiva de forma habitual sin un entrenamiento riguroso, considerándose sujetos activos, pertenecientes todos ellos a la Facultad de Ciencias del Deporte de la Universidad de Extremadura. En la tabla 1 se describen las características del grupo.
- b) **Grupo de sujetos *entrenados* (n = 15):** compuesto por deportistas entrenados en deportes de resistencia que seguían un plan de entrenamiento orientado a la competición de alto nivel, con un mínimo de 10 horas semanales de entrenamiento. En la tabla 2 se describen las características del grupo.

Todos los sujetos participantes en el estudio fueron informados del mismo y aceptaron su participación voluntaria mediante la firma de un informe consentido.

Edad (años)	Altura (cm)	Peso (kg)	% muscular	% graso	% óseo	% residual
20,91	175,27	71,00	53,52	10,11	12,26	24,1
$\pm 1,31$	$\pm 6,10$	$\pm 5,52$	$\pm 1,51$	$\pm 1,09$	$\pm 0,96$	$\pm 0,00$

Tabla 1. Características del grupo no entrenados.
Datos expresados como media \pm desviación estándar ($X \pm SD$)

Edad (años)	Altura (cm)	Peso (kg)	% muscular	% graso	% óseo	% residual
23,83	176,00	66,94	50,96	8,57	16,37	24,1
$\pm 2,32$	$\pm 3,65$	$\pm 3,59$	$\pm 0,96$	$\pm 1,22$	$\pm 2,93$	$\pm 0,00$

Tabla 2. Características del grupo entrenados.
Datos expresados como media \pm desviación estándar ($X \pm SD$)

La composición corporal fue calculada según las indicaciones del grupo español de cineantropometría (Porta *et al.*, 1993).

El **porcentaje graso** fue calculado mediante la ecuación de Yuhasz (Porta *et al.*, 1993).

$$\% \text{ Graso: } 3,64 + (\text{suma } 6 \text{ pliegues cutáneos} \times 0,097)$$

Los pliegues cutáneos se determinaron con el uso del plicómetro en el hemisferio dominante de los sujetos del siguiente modo:

- **Abdominal:** a la derecha de la cicatriz umbilical, en sentido vertical.
- **Suprailíaco:** ubicado en el punto de corte formado por la línea del borde superior del íleon y una línea que uniría la espina iliaca antero – superior con el borde axilar anterior. El pliegue se tomó medialmente hacia abajo formando un ángulo de 45° con la horizontal.
- **Tricipital:** ubicado en la parte posterior del brazo, en el punto medio acromio – radial. La dirección del pliegue es vertical.
- **Subescapular:** situado justo debajo del pico inferior de la escápula en dirección oblicua hacia abajo y afuera, con una angulación de 45° respecto la horizontal.

- **Muslo:** tomado en la parte anterior del muslo, a la mitad del segmento en dirección vertical, con el sujeto sentado con una flexión de rodilla de 90° y los pies apoyados en el suelo.
- **Pierna:** tomado en la parte medial de la pierna donde ésta alcance su máxima circunferencia. El pliegue tendrá una dirección vertical.

El % **óseo** se calculó a partir del **peso óseo**, utilizando la ecuación de Von Döbeln y Rocha (Porta *et al.*, 1993).

$$\text{Peso Óseo} = 3,02 \times (\text{Talla}^2 \times \text{D. Biestiloideo} \times \text{D. Bicondiloideo(fémur)} \times 400)^{0,712}$$

Los diámetros se determinaron en el hemisferio dominante de los sujetos del siguiente modo:

- **Bicondíleo de fémur:** distancia entre el cóndilo medial y lateral del fémur. Las ramas del paquímetro ubicadas hacia abajo y en la bisectriz del ángulo formado por la rodilla, en este caso 90°.
- **Biestiloideo:** distancia entre las apófisis estiloides del radio y cúbito. Las ramas del paquímetro ubicadas hacia abajo y en la bisectriz del ángulo formado por la muñeca, en este caso 90°.

El **porcentaje residual** fue determinado mediante la ecuación de Wurch (Porta *et al.*, 1993) que lo considera un valor constante de 24,1 % para hombres, lo que hace que todos tengan el mismo y la desviación estándar sea 0.

El **porcentaje muscular** fue determinado (Porta *et al.*, 1993) a partir del cálculo del peso muscular, que se determinó mediante la diferencia entre el peso total y el resto de pesos: óseo, residual y graso.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo está basado en un estudio experimental, que viene definido por una serie de variables, tanto dependientes como independientes, que nos permiten comparar va-

rias situaciones diferentes de esfuerzo físico, para intentar determinar las diferencias existentes entre ellas.

En este caso, la variable independiente es el **tipo de esfuerzo físico** que los sujetos debían realizar, consistentes en una prueba de esfuerzo incremental máxima y una prueba de esfuerzo en estado estable, de una intensidad del 80% del VO₂ máximo.

Como variables dependientes, podemos distinguir:

Parámetros espirométricos, que vienen definidos por el consumo máximo de oxígeno relativo (VO₂ máximo, medido en mL/kg/min), volumen de dióxido de carbono absoluto (CO₂, medido en mL/min), frecuencia cardiaca (FC, medida en pulsaciones por minuto, ppm), y cociente respiratorio (RER).

Parámetros de estrés, que vienen definidos por niveles de lactato (medido en mmol/L), malondialdehído (MDA, medido en μM), vitamina A, C y E (μg/mL), determinados tanto en plasma como en eritrocitos.

Parámetros hormonales, definidos por niveles de esteroides (andrógenos, estrógenos, corticosteroides). Entre ellos destacamos la androsterona y eticolanolona, metabolitos urinarios de la testosterona, la testosterona, epitestosterona, DHT, DHEA, androstenediona, estrona, β- estradiol, cortisol, cortisona, tetrahydrocortisol y tetrahydrocortisona, metabolitos del cortisol y cortisona.

Para la valoración del estrés oxidativo, se extrajeron distintas tomas de sangre de la vena antecubital mediante el sistema Vacutainer en tubos de cristal de 10 ml con heparina de litio.

- a) Antes del inicio de las pruebas que sirvió como blanco, denominada **INICIAL**.
- b) Al término de las pruebas denominada **FINAL**.

Tras la extracción sanguínea, las muestras eran inmediatamente centrifugadas a 3000 r.p.m durante 10 minutos en una centrifugadora meditrónica. La sangre total quedaba separada en plasma y eritrocitos, guardando el plasma en tubos de ependorf de 1mL y

congelándolos a -30°C para la posterior determinación de los diferentes parámetros. Por su parte, los eritrocitos fueron guardados en tubos de cristal de 10 mL.

A todas las muestras sanguíneas se les determinó el hematocrito mediante la centrifugación de 25 μL de sangre total contenida en capilares heparinizados durante 10 minutos en una microcentrifugadora Alresa, para la corrección de los datos con la modificación de este parámetro.

A nivel de eritrocitos, los datos fueron corregidos con la modificación de la hemoglobina, determinada mediante espectrofotometría con un Kit comercial de Sigma.

Igualmente, para valorar el estrés hormonal producido por los distintos esfuerzos, se recogieron muestras de orina, en tubos de vidrio de 10 mL.

- c) Antes del inicio de las pruebas que sirvió como blanco, denominada **INICIAL**.
- d) La primera orina tras el final de las pruebas denominada **FINAL**.

Tras la recogida de las muestras, éstas fueron almacenadas en tubos de 10 mL, y congeladas a -30°C para su posterior análisis. Los datos fueron corregidos con la creatinina, determinada por espectrofotometría mediante un kit comercial de Sigma.

3.5 VALORACIÓN DEL RENDIMIENTO FISICO

Las pruebas llevadas a cabo pretendían valorar el rendimiento físico a diferentes volúmenes e intensidades, diferenciando 2 tipos diferentes de esfuerzos:

- Prueba de esfuerzo máximo: prueba ergoespirométrica máxima incremental hasta el agotamiento voluntario, con una duración de 15 minutos aproximadamente, según el grado de entrenamiento de los sujetos.
- Prueba de esfuerzo submáxima a intensidad de un 75-80% del VO_2 máximo: prueba en estado estable con una duración máxima de 30 minutos de esfuerzo continuo.

De esta forma, intentamos determinar el efecto que dos ejercicios físicos de diferente intensidad y duración tienen sobre los sistemas antioxidantes y hormonal esteroideo de nuestros sujetos de estudio.

3.5.1 Prueba de esfuerzo máxima

Con esta prueba intentamos determinar la potencia aeróbica máxima, que es considerada como la mayor cantidad de energía obtenida por unidad de tiempo mediante un metabolismo aeróbico, alcanzando el consumo máximo de oxígeno, expresado como VO_2 máximo (Wilmore & Costill, 1998).

Para evaluar la potencia aeróbica máxima se realizó un test en un cicloergómetro de freno electromagnético de la marca Ergoline® (Ergo-metrics 900), con un protocolo en escalón incremental máximo.

Tras un calentamiento de 10 minutos a una intensidad de 100 vatios, los sujetos comenzaban el test con un escalón inicial de 100 vatios de carga e incrementando ésta cada 2 minutos en 50 vatios hasta los 300 vatios donde la carga se incrementaba de 25 en 25 vatios hasta la máxima extenuación voluntaria.

La respuesta fisiológica en parámetros ergoespirométricos era controlada mediante un *analizador de gases* (MGC, model nº 762014-102) y un *pulsómetro* (Polar® “Vantage NV”). Los datos fueron analizados con el software Polar Precision Performance de Polar tras la transmisión de los datos con el interface (Polar® Advantage interface), propio de la marca finlandesa. Las pruebas fueron llevadas a cabo con un intervalo temporal de tres días, con el objetivo de favorecer la recuperación de los sujetos y eliminar posibles adaptaciones al esfuerzo.

En plasma se determinó la concentración final de lactato mediante espectrofotometría (Unicam 5625 UV/VIS) con el kit comercial de Sigma.

3.5.2 Prueba de esfuerzo submáxima al 75-80% del VO₂ máximo

Proxima a esta zona de esfuerzo, en condiciones normales, encontramos el umbral anaeróbico del individuo, punto éste de gran interés en la fisiología del ejercicio ya que nos marca el punto en el que el metabolismo anaeróbico juega un papel predominante como sistema de restitución del ATP y supone para el organismo un estado de claro desequilibrio. Nuestro interés fue evaluar los efectos que esta situación produce en los sistemas antioxidantes y de hormonas esteroideas urinarias.

Para nuestro estudio, llevamos a cabo un esfuerzo en estado estable sobre cicloergómetro, a una intensidad inferior al umbral anaeróbico, en torno al 80% del VO₂ máximo, durante 30 minutos, con 15 minutos previos de calentamiento a una intensidad del 50-60% del VO₂ máximo. La intensidad de la carga era calculada a partir de los datos obtenidos en la prueba incremental máxima.

El metabolismo principal empleado en este test es el de la oxidación de hidratos de carbono, a una intensidad relativa cercana al umbral anaeróbico pero sin sobrepasarlo y por tanto sin disparar las concentraciones de lactato.

La respuesta fisiológica ergoespirométrica fue controlada con un analizador de gases MGC, modelo nº 762014-102 y un pulsómetro Polar modelo Vantage NV. Los datos fueron analizados con el software Polar Precision Performance de Polar tras la transmisión de datos con el interface propio de la marca finlandesa. Los valores se registraban cada 5 minutos de esfuerzo y en los minutos 1 y 3 de la recuperación.

En plasma se determinó la concentración final de lactato mediante espectrofotometría (Unicam 5625 UV/VIS) con el kit comercial de Sigma.

3.6 VALORACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Para la valoración del estrés oxidativo producido por las diferentes actividades, y la respuesta del organismo ante estos esfuerzos, diferenciaremos entre:

- Marcadores de estrés oxidativo y peroxidación lipídica.
- Respuesta antioxidante no enzimática.

3.6.1 Marcadores de estrés oxidativo y peroxidación lipídica

El marcador utilizado como producto final de la peroxidación lipídica fue el malondialdehído (MDA), determinado en plasma y en eritrocitos mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) descrita por Esterbauer (Esterbauer *et al.*, 1984) y reseñada a continuación.

A 100 μL de plasma se le añaden 100 μL de acetonitrilo agitándolo en vórtex durante 1 minuto. A continuación se centrifuga a 12000 r.p.m durante 5 minutos y se recoge el sobrenadante, 20 μL de los cuales son inyectados para su análisis mediante HPLC.

Para el análisis en eritrocitos, tras el lavado de los mismos con cloruro sódico al 0,9%, realizamos una dilución al 50%. De esta forma, para determinar el MDA, tomamos el doble de cantidad respecto al procedimiento expuesto anteriormente.

La columna utilizada fue una Brownlee AS-WP. De 10 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, usando como fase móvil acetonitrilo: Tris 0,03 M pH 7,4 (1:9) a un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 270 nm.

Teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra y utilizando una recta patrón construída a partir de MDA comercial, se puede calcular la concentración μM plasmática y eritrocitaria de MDA en la muestra.

3.6.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Respecto al estudio de los sistemas antioxidantes, centramos nuestro trabajo en la respuesta de los sistemas antioxidantes no enzimáticos, concretamente de las vitaminas A, C, y E.

Vitamina C

Esta vitamina actúa como antioxidante en medios acuosos al ser vitamina hidrosoluble. Para su determinación se utilizó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) según la técnica descrita por Manoharan (Manoharan & Schwille, 1994).

A 100 μL de plasma se le añaden 100 μL de ácido perclórico al 10% mezclado con ácido metafosfórico al 1% agitándose en vórtex durante 30 segundos y conservando en nevera durante 20 minutos. Posteriormente se añaden 200 μL de fase móvil y se centrifuga a 12000 r.p.m durante 2 minutos. Se recogen 20 μL de sobrenadante siendo inyectados para la determinación de la vitamina C mediante HPLC.

Para el análisis en eritrocitos, tras el lavado de los mismos con cloruro sódico al 0,9%, realizamos una dilución al 50%. De esta forma, para determinar la vitamina C, tomamos el doble de cantidad respecto al procedimiento expuesto anteriormente.

La columna utilizada fue una C18 de 11 cm de longitud y 4,7 mm de diámetro interno, usando como fase móvil fosfato amónico 20 mM: 0.015% metafosfórico a un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 240 nm.

Teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra y utilizando una recta patrón construida con ácido ascórbico comercial, se puede calcular la concentración plasmática y eritrocitaria en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina C en la muestra.

Vitaminas A y E

Estas vitaminas actúan como antioxidantes en medios lipídicos como es la membrana celular, al ser vitaminas liposolubles. Para su determinación se utilizó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) según la técnica descrita por Shearer (Shearer, 1986) reseñada a continuación.

A 100 μL de plasma se le añaden como patrón interno 100 μL de acetato de alfa – tocoferol en etanol (50 mg/L) agitándose en vórtex durante 30 segundos. A continuación se le añade 200 μL de n – hexano y se agita de nuevo durante otros 30 segundos. Posteriormente se agita mecánicamente durante 10 minutos para proceder a una centrifugación a 3000 r.p.m durante 5 minutos. Una vez finalizada la centrifugación se extrae la capa superior y se seca en corriente de N_2 a 40° C. Inmediatamente antes de medir por HPLC se reconstituye en 100 μL de etanol, inyectándose 20 μL para la determinación de la vitamina E.

Para el análisis en eritrocitos, tras el lavado de los mismos con cloruro sódico al 0,9%, realizamos una dilución al 50%. De esta forma, para determinar la vitamina A y E, tomamos el doble de cantidad respecto al procedimiento expuesto anteriormente.

La columna utilizada fue una Brownlee OD-MP de 10 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, usando como fase móvil diclorometano en metanol 7% (v/v) a un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 292 nm.

Mediante la comparación de áreas con el patrón interno, se puede calcular la concentración plasmática y eritrocitaria en μg /mL de vitaminas A y E en la muestra.

3.7 VALORACION DEL PERFIL ESTEROIDEO

Con el análisis del perfil esteroideo en orina, pretendemos determinar cómo afectan los diferentes tipos de esfuerzo físico al comportamiento de las hormonas anabólicas y catabólicas, para valorar la carga de trabajo y el estrés sometido.

Los análisis se realizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas según los métodos de Galán et al., 2001 (Galan Martin et al., 2001), y de Rivero et al., 2001 (Rivero-Marabe *et al.*, 2001), determinándose:

- Dehidroepiandrosterona (DHEA), andrógeno suprarrenal
- Androstenodiona, andrógeno suprarrenal
- Testosterona (T)
- Epitestosterona (E)
- Androsterona y Etiocolanolona
- β -estradiol
- Estrona
- Tetrahydrocortisol (THCol) y Tetrahydrocortisona (THC), metabolitos urinarios del cortisol y de la cortisona, hormonas suprarrenales catabólicas.

Así como las relaciones:

- Andrógenos testiculares totales / Corticosteroides totales
- Andrógenos suprarrenales totales / Corticosteroides totales
- Testosterona/Tetrahydrocortisona (T/THC)
- Testosterona/Tetrahydrocortisol (T/THCol)
- Dehidroepiandrosterona/Tetrahydrocortisona (DHEA/THC)
- Dehidroepiandrosterona/ Tetrahydrocortisol (DHEA/THCol).

Las muestras de orina siguieron un método de preparación, puesto que los compuestos objetos de estudio requieren unas etapas de aislamiento y acondicionamiento. Los compuestos que se pretenden analizar no se encuentran sólo en estado libre, sino también en estado conjugado, mayoritariamente con el ácido glucurónico además de como sulfatos.

En este proceso de preparación de las muestras distinguimos tres fases:

- Hidrólisis
- Extracción
- Derivatización

No obstante, hay que mencionar que los procesos seguidos para la determinación de andrógenos y corticosteroides varían ligeramente.

3.7.1 Determinación de andrógenos y corticosteroides en orina

Hidrólisis:

- Se toman 2 mL de orina y se centrifuga a 3000 r.p.m durante 3 minutos, cambiándola de vial posteriormente.
- Se ajusta a pH 5 con 50 μ L de ácido acético 1M y 300 μ L de tampón acético acetato.
- Se añaden 25 μ L de patrón interno (metiltestosterona).
- Se añaden 50 μ L de arilsulfatasa y se incuba durante 15 horas a 50° C.

Extracción:

- Se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente (10 minutos).
- Se tampona la orina a pH 9,5 con 100 μ L de NaOH 1M y 300 μ L de tampón bicarbonato carbonato.
- Se añaden 2 mL de éter dietílico, y se agita 30 minutos en el vórtex.
- Una vez agitado centrifugamos a 3000 r.p.m durante 2 minutos, para eliminar la interfase.
- Se congela para separar las fases perfectamente.
- Se deseca la parte orgánica, ya sea en rotavapor, con nitrógeno o con centrifuga con cámara de vacío, hasta no quedar restos de líquido.

Derivatización:

- La derivatización de la muestra se realiza por la adición de una mezcla MSTFA, yoduro amónico y ditioeritritol en proporción de 1mL:2mg:4mg. La re-

acción se realiza con 50 μL del derivatizante a 60° C en placa durante 30 minutos.

- La mezcla resultante se trasvasa a un vial y se encapsula rápidamente, para evitar en lo posible la reaccionabilidad de estos compuestos con la humedad ambiente, hasta su análisis por cromatografía gaseosa, inyectándose 1 μL al cromatógrafo.

3.7.2 Determinación de creatinina en orina

En esta metódica de ensayo, se estudió otro parámetro que es la concentración de creatinina en la misma orina en la que posteriormente analizaríamos los esteroides. El objetivo de esta medición es poder normalizar los resultados obtenidos en función de la excreción renal y en relación a esta sustancia, ya que mantiene un nivel de excreción constante.

El material empleado para la realización de este análisis fue: espectrofotómetro de doble haz de Shimadzu; solución madre de creatinina 2g/L en HCl 25mM, HCl 25mM, NaOH 1,4M y ácido pícrico 14mM fueron suministrados por Scharlau laboratorios.

Recta de calibrado de la creatinina

Utilizaremos 6 puntos para obtener dicha recta para lo cual prepararemos 6 tubos de concentración conocida entre 0 g/L (0,0 mL de patrón de creatinina) y 0,125 g/L (1,0 mL de patrón de creatinina).

Preparación de los patrones.

Tomamos la solución madre de creatinina de 2g/L y la diluimos 1 a 10 con HCl 25mM. Para preparar dichos patrones se recomienda la utilización de los siguientes volúmenes de patrón de creatinina diluida (tabla 3) completando hasta un volumen de 1,6 mL con HCl 25mM.

Tubo	1	2	3	4	5	6
HCl 25mM	1,60	1,40	1,20	1,00	0,80	0,60
V (mL) patrón creatinina (0,2 g/L)	0,00	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00
Vtotal(mL)	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60
Creatinina (g/L)	0,00000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125*

Tabla 3. Preparación de los patrones.

(* concentración a partir de la cual se pierde la linealidad de la recta de calibrado, correspondiente a una absorbancia de 2,799. Por ello, este punto es eliminado de la misma).

Medida de absorbancia.

Una vez preparado los patrones se procede a medir la absorbancia de los mismos en el espectrofotómetro. Para ello se hace reaccionar la creatinina con ácido pícrico para obtener un complejo coloreado lo cual no sucede hasta que se añade hidróxido sódico (NaOH 1,4M).

Por lo tanto para medir la absorbancia se toman los tubos y se le añade 1,5 mL de ácido pícrico (14mM), se agita y se deja estabilizar 1 ó 2 minutos. Posteriormente se añaden 0,80 mL de NaOH (1,4M) y se agita. Se deja que la reacción se complete durante 50 minutos y posteriormente procedemos a realizar la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm.

Para obtener la recta de calibrado representamos la concentración de los patrones frente a la absorbancia de los mismos obteniendo la ecuación correspondiente; a partir de la sustitución en la misma, de la absorbancia de la muestra problema, obtenemos la concentración después de aplicar la dilución correspondiente.

Preparación y medida de la muestra problema

Se toman 1,6 mL de orina, previamente diluida con agua destilada lo suficiente como para que la absorbancia de la misma esté dentro del rango de la recta de calibrado, en nuestro caso 2,799 (a partir de este valor se pierde la linealidad), aunque para asegurarnos de ello tomaremos como referencia un valor de absorbancia de 2,500. Normalmente una dilución 1 a 20 ó 1 a 30 es suficiente. Hay algunas orinas, debido a su concentración (de creatinina), para las cuales esta dilución no es suficiente; si al aplicar dicha dilución la absorbancia sale fuera del rango de la recta de calibrado, es decir de nuestro

valor de referencia (2,500), se diluye hasta que caiga dentro del mismo. La concentración de creatinina en la muestra problema se calcula teniendo en cuenta la dilución realizada.

3.8 ANALISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los resultados fue realizado mediante el programa SPSS 11.0 para Windows.

Debido a que las variables analizadas no cumplían las condiciones de normalidad de la curva, curtosis y asimetría entre ± 1 con el número de sujetos empleado, se utilizó una alternativa no paramétrica, el test de Wilcoxon para muestras autopareadas, que nos indica la tendencia de los resultados siendo cada sujeto control de si mismo.

Por otro lado, para determinar las diferencias entre grupos a nivel ergoespirométrico, realizamos el test ANOVA para muestras repetidas, donde el factor intrasujetos correspondía al test ergométrico y el factor intersujetos al grado de entrenamiento.

Se aceptaron como significativas aquellas diferencias con una probabilidad de ser debidas al azar menor al 5 % ($p < 0,05$).

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Los resultados de la presente tesis los estructuraremos en 3 grandes grupos, de la siguiente manera:

1. Valoración del rendimiento físico.
2. Valoración del estrés oxidativo y respuesta antioxidante no enzimática en plasma y eritrocitos
3. Valoración del estrés sobre hormonas esteroideas en orina

La valoración del rendimiento físico, el estrés oxidativo y la respuesta antioxidante se llevó a cabo con ambos grupos experimentales, “entrenados” y “no entrenados”, mientras que la valoración del estrés hormonal solamente fue realizada con el grupo de “entrenados”, en las 2 situaciones de esfuerzo planteadas.

4.1 VALORACIÓN DEL RENDIMIENTO FÍSICO

4.1.1 Valoración del rendimiento en la prueba máxima

En la tabla 4 se muestran los resultados ergoespirométricos obtenidos durante las pruebas incrementales máximas, tanto en sujetos “sedentarios” como en “entrenados”. Los parámetros estudiados fueron: consumo de oxígeno máximo relativo (VO_2) medido en mL/kg/min, volumen de dióxido de carbono absoluto (VCO_2) medido en ml/min, volumen espirado (VE) L/min, frecuencia respiratoria máxima (RR) medida en respiraciones por minuto, cociente respiratorio máximo (RER) y frecuencia cardíaca máxima (FC) medida en pulsaciones por minuto.

	Tiempo	Carga (w)	FC (ppm)	VO ₂ (mL/kg/min)	VCO ₂ (mL/min)	VE (L/min)	RER
No entrenados	11'35'' ± 1' 45''	328 ± 24	184 ± 5	38,47 ± 4,99	4050 ± 598	123,14 ± 22,30	1,46 ± 0,14
Entrenados	15'56''*** ± 4'15''	364* ± 53,30	182 ± 6	65,53** ± 9,35	5074 ± 701	141,08* ± 27,55	1,13* ± 0,05

Tabla 4 Valores obtenidos en el test incremental máximo.
(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ en comparación "no entrenados" y "entrenados").

Como aspecto más importante, podemos observar la diferencia significativa encontrada en el cociente respiratorio ($p < 0,01$), entre sujetos entrenados y no entrenados, lo cual podría indicar una mayor utilización del metabolismo oxidativo, utilizando ácidos grasos para la obtención de energía, reservando así el glucógeno para intensidades mayores de esfuerzo.

El consumo de oxígeno, tiempo de trabajo, carga movilizada y volumen espirado también fueron superiores en sujetos entrenados, relacionados con las adaptaciones al entrenamiento de resistencia realizado por estos sujetos.

4.1.2 Valoración del rendimiento en la prueba de estado estable aeróbica

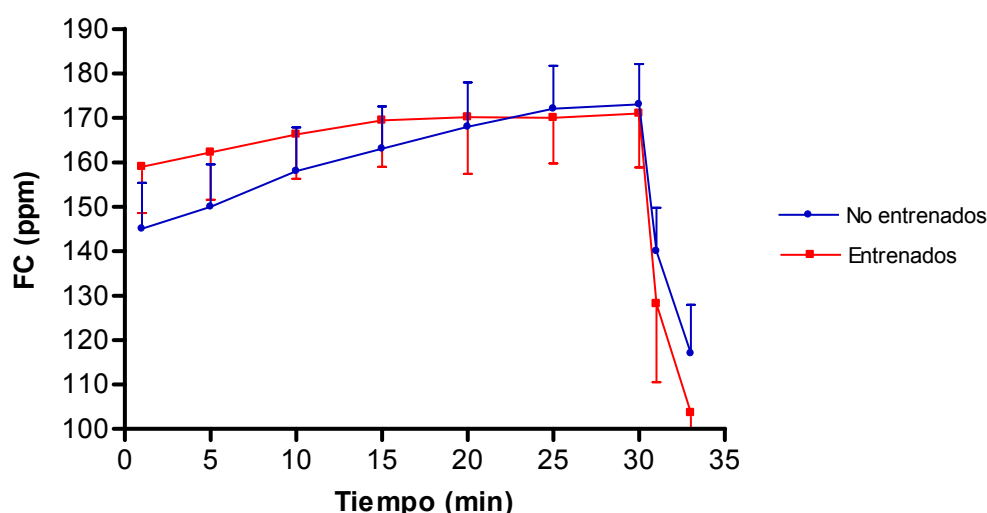
Los registros ergoespirométricos del test submáximo de estado estable al 80% del VO₂ máximo se muestran en las gráficas 2 a 7.

Los parámetros estudiados fueron: consumo de oxígeno máximo relativo (VO₂) medido en mL/kg/min, volumen de dióxido de carbono absoluto (VCO₂) medido en mL/min, volumen espirado (VE) L/min, frecuencia respiratoria máxima (RR) medida en respiraciones por minuto, cociente respiratorio máximo (RER) y frecuencia cardiaca (FC) medida en pulsaciones por minuto.

Los valores son mostrados cada 5 minutos y en los minutos 1 y 3 de la recuperación.

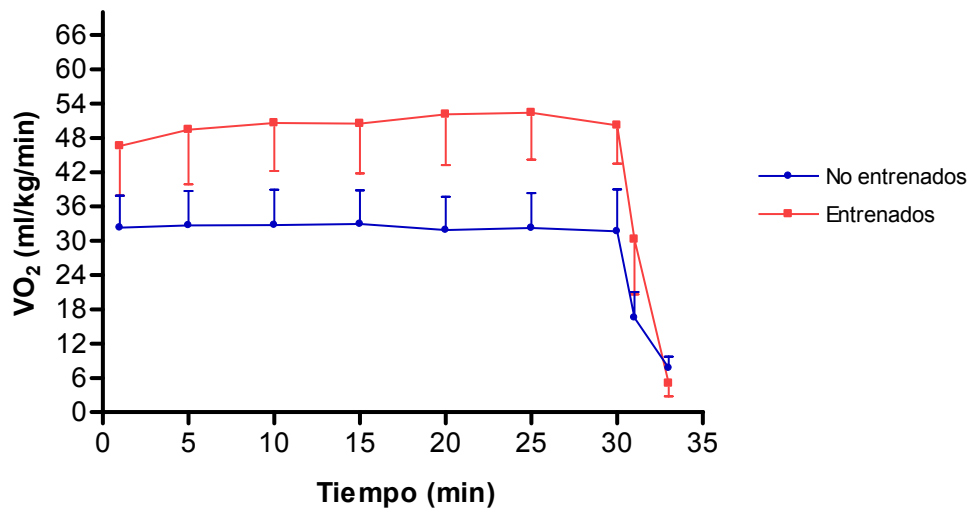
Respecto a la frecuencia cardiaca (gráfica 2), observamos como lo sujetos “entrenados” alcanzaron valores ligeramente inferiores durante la prueba, estadísticamente significativos ($p < 0,05$), que podrían ser debido a su mayor eficiencia del sistema aeróbico a intensidades submáximas de esfuerzo.

Cabe destacar la pendiente del grupo de “no entrenados”, que incrementó hasta final de la prueba, lo cual podría indicarnos una eficiencia menor de su sistema aeróbico, debido a la falta de entrenamiento. Otra diferencia destacable en ambos grupos, fue la recuperación, ya que podemos observar como el grupo de “entrenados” alcanzó valores prácticamente basales después de 3 minutos de finalizar el esfuerzo, aspecto éste que no ocurrió en el grupo de “no entrenados”, cuya FC permaneció más elevada durante un tiempo mayor.

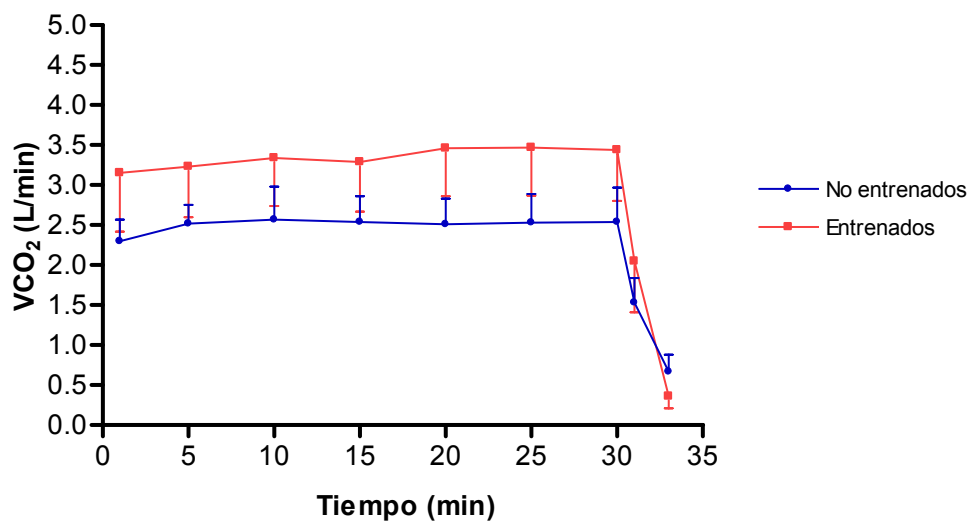


Gráfica 2 Valores obtenidos en FC en el test de estado estable.

En la gráfica 3, mostramos los valores obtenidos en VO_2 durante la prueba de estado estable. El grupo de “entrenados” presentaron niveles de VO_2 mayores que el grupo de “no entrenados”, siendo esta diferencia estadísticamente significativa durante toda la prueba ($p < 0,05$). En este sentido, podemos observar como la pendiente de recuperación, durante los 3 minutos posteriores al esfuerzo, es mayor en sujetos “entrenados”, que en “no entrenados”.

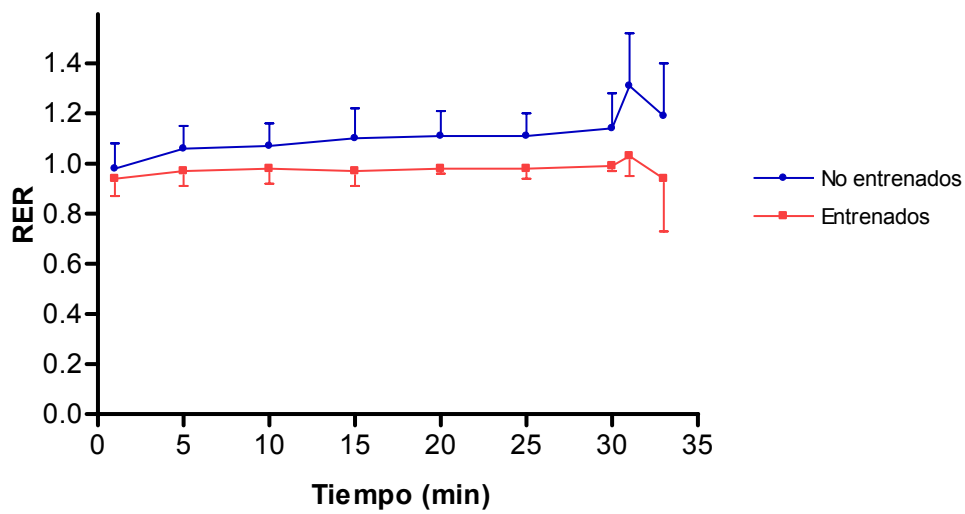


Gráfica 3. Valores obtenidos en VO_2 en el test de estado estable.



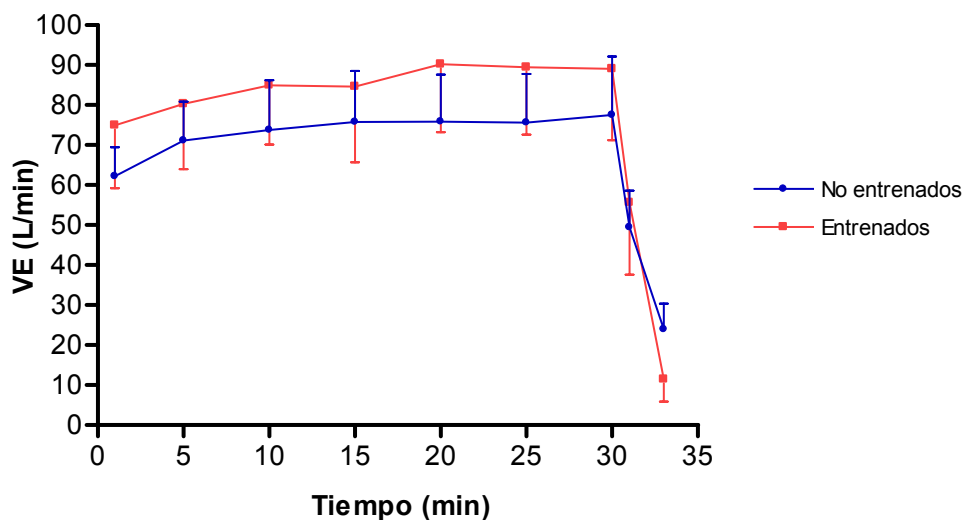
Gráfica 4. Valores obtenidos en VCO_2 en el test de estado estable.

Los valores obtenidos en VCO_2 durante el esfuerzo estable fueron superiores en el grupo de “entrenados”, aunque con menor diferencia que ocurría con el VO_2 , lo cual podría indicarnos una mayor eficiencia del sistema aeróbico, que se verá claramente influenciada en el cociente respiratorio. A los 3 minutos de finalizar el esfuerzo, los sujetos “entrenados” presentaban niveles de CO_2 inferiores al grupo de los “no entrenados”, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), alcanzando valores muy cercanos a los basales. No ocurría lo mismo en el grupo de “no entrenados”, donde el VCO_2 permanecía elevado durante más tiempo.



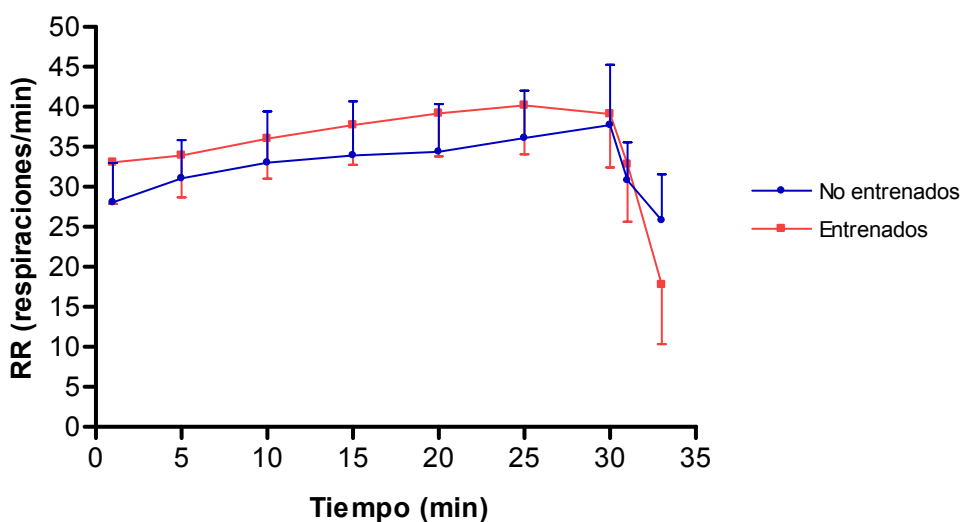
Gráfica 5. Valores obtenidos en RER en el test de estado estable.

Como consecuencia de los valores obtenidos en VO_2 y en VCO_2 en ambos grupos, podemos observar como el cociente respiratorio, que nos indica la relación existente entre estos dos parámetros, y el tipo de sustrato energético utilizado, es superior en el grupo de “no entrenados”. Esta diferencia entre grupos de RER va incrementándose a lo largo de toda la prueba. Destacar la mayor diferencia existente en el primer minuto de la recuperación, debido a la mayor diferencia en los parámetros de VO_2 y VCO_2 en ambos grupos.



Gráfica 6. Valores obtenidos en VE en el test de estado estable.

Cabe destacar como los sujetos “entrenados” presentaban niveles más elevados en volumen espirado durante toda la prueba de esfuerzo, capaces de captar mayor cantidad de litros de aire por minuto. Un aspecto importante a destacar, es la recuperación. Los sujetos entrenados, presentaban valores cercanos a los basales después de tres minutos de finalización de la actividad, a diferencia del grupo de los “no entrenados”, cuyos valores permanecían elevados durante un mayor tiempo. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa ($p < 0,05$) durante todo el esfuerzo.



Gráfica 7. Valores obtenidos en RR en el test de estado estable.

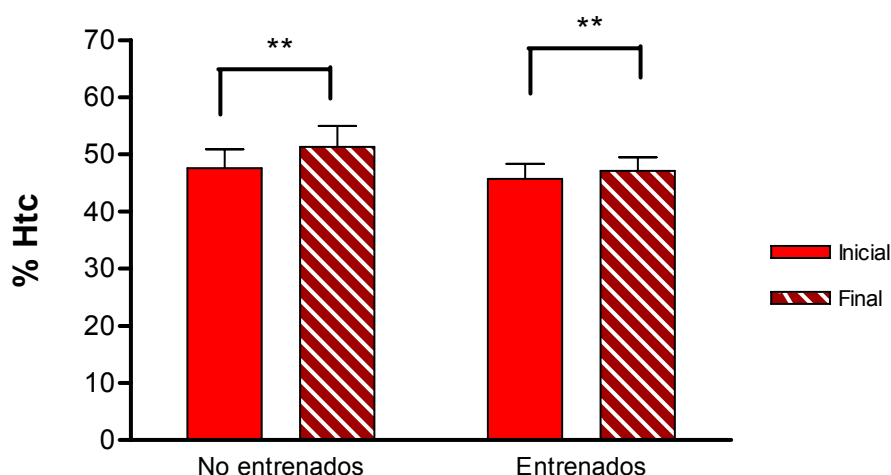
Podemos observar, como durante toda la prueba, el grupo de “entrenados” presentaba valores más elevados en Frecuencia Respiratoria, aunque al final de la prueba los datos son prácticamente similares, debido a la menor adaptación que el grupo de “no entrenados” presenta relacionada con este tipo de actividad. Durante la recuperación observamos como los sujetos “entrenados” alcanzaron valores basales a los 3 minutos de finalizar el esfuerzo, mientras que el grupo de los “no entrenados” mantenía la RR elevada durante más tiempo.

4.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES

A continuación presentamos los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras sanguíneas, para determinar el estrés ocasionado por las diferentes situaciones de esfuerzo, y establecer diferencias entre ambas, tanto en grupos de “entrenados” como en “no entrenados”.

4.2.1 Hemoconcentración y valoración del lactato

Las gráficas 8 y 9 muestran las modificaciones del Hematocrito (Htc), con la realización de ejercicio físico, tanto en sujetos “entrenados” como en “no entrenados”, en la prueba de esfuerzo máxima y estable.

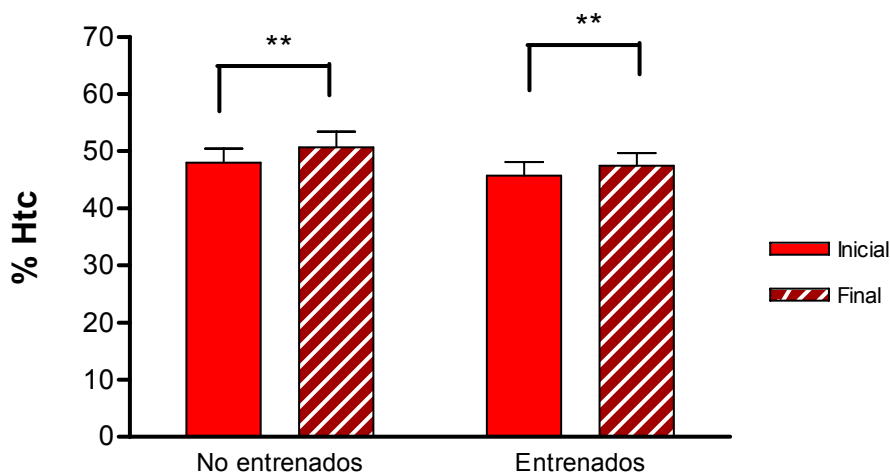


Gráfica 8. Modificaciones del Hematocrito (Htc) en el test de esfuerzo máximo. (** $p < 0,001$ en comparación “inicial” y “final”).

Se aprecia como tras el esfuerzo realizado se incrementan la tasa de hematocrito en todos los sujetos, siendo este cambio estadísticamente significativo ($p < 0,001$), aunque sin que el tipo de esfuerzo produjera diferencias significativas entre los grupos. Hay que tener en cuenta este suceso, pues al final de la prueba, los sujetos “no entrenados” presentaban un Htc mayor de 51%, lo que podría indicar un exceso de pérdida de volumen plasmático, y una mayor viscosidad sanguínea.

La importancia de este parámetro radica en el hecho de las posibles modificaciones que pueden sufrir los demás parámetros debido a la hemoconcentración producida tras la

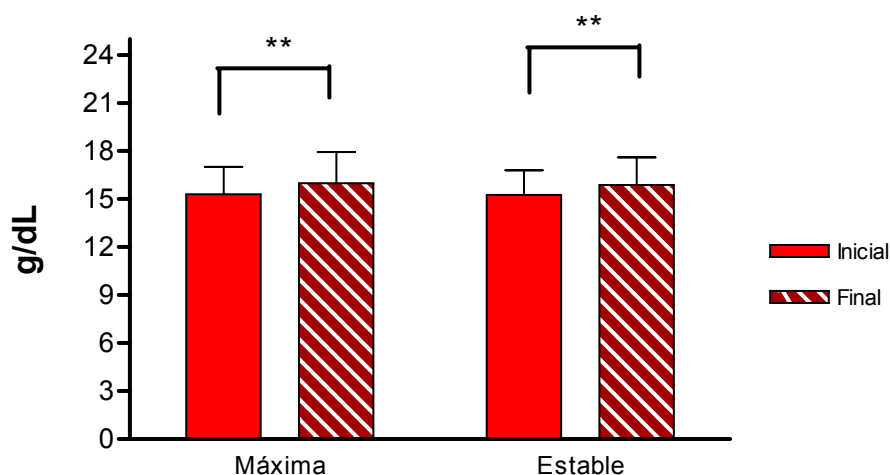
realización de ejercicio. Es por ello que todos los datos que expresaremos relacionados con niveles plasmáticos, estarán corregidos respecto al Htc.



Gráfica 9. Modificaciones del Hematocrito (Htc) en el test de esfuerzo estable. (** $p < 0,001$ en comparación "inicial" y "final").

Los cambios producidos en la prueba de esfuerzo submáxima son similares a los de la prueba máxima, con aumentos significativos de la tasa de hematocrito en ambos grupos experimentales ($p < 0,001$), sin diferencias significativas entre ambos, aunque con niveles más elevados en sujetos "no entrenados", posiblemente debido al mayor estrés que les supone este esfuerzo, mayor producción de energía, mayor producción de calor, y en definitiva, menores adaptaciones a esfuerzos de esta intensidad.

Al igual que ocurre con el hematocrito, para la corrección de los datos obtenidos en eritrocitos, hemos observado la modificación experimentada por la Hemoglobina, de forma que podamos interpretar correctamente los parámetros eritrocitarios. En la gráfica 10 mostramos las modificaciones observadas en Hemoglobina (Hb), en sujetos entrenados, durante ambos esfuerzos. Por cuestiones experimentales no disponemos de la Hb en sujetos "no entrenados".



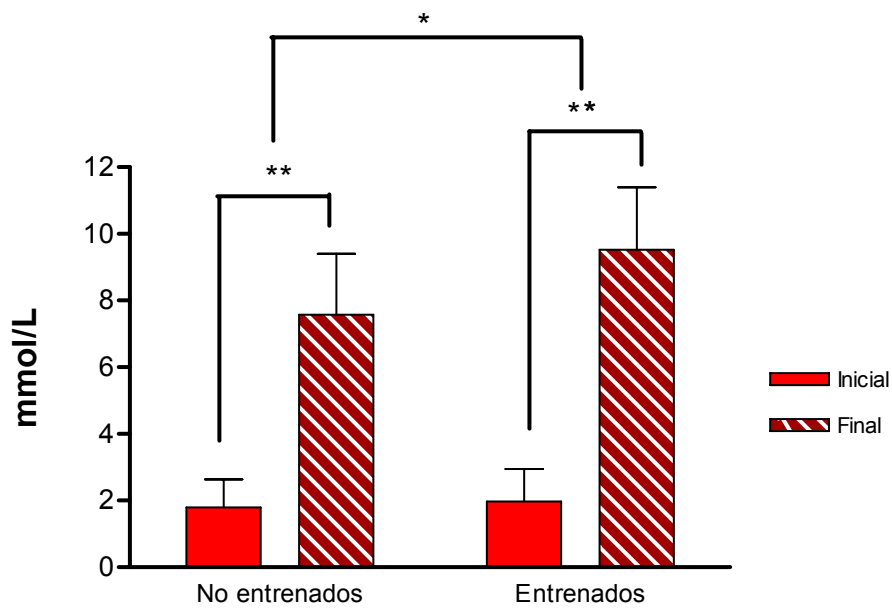
Gráfica 10. Modificaciones de la Hemoglobina (Hb) en el test de esfuerzo máximo y estable en sujetos entrenados. (** $p < 0,001$ en comparación "inicial" y "final").

Las modificaciones sufridas por la Hb son similares en ambas pruebas, siendo estadísticamente significativas ($p < 0,001$) antes y después del esfuerzo, y sin diferencias entre las 2 situaciones experimentales.

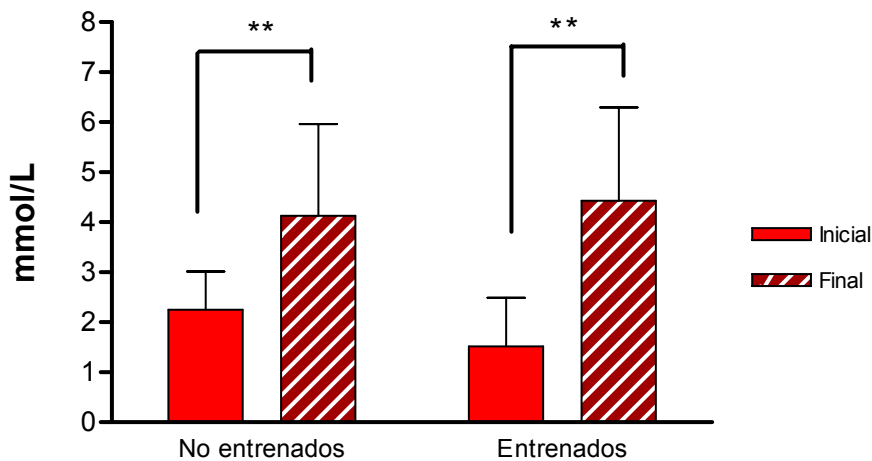
Estas modificaciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar los datos obtenidos en los parámetros eritrocitarios.

El primer parámetro de estrés que vamos a analizar, que hace referencia a la intensidad de ejercicio planteado, es el lactato. En las gráficas 11 y 12, mostramos las modificaciones sufridas por este parámetro, tanto en la prueba de esfuerzo máximo, como en estado estable, y tanto en sujetos "entrenados", como en "no entrenados".

En la prueba de esfuerzo máxima podemos observar niveles significativamente más elevados en ambos grupos, después de la actividad ($p < 0,001$), respecto a los valores de reposo. El grupo de "entrenados" alcanzó niveles mayores de lactato tras la prueba, con diferencias significativas respecto al grupo de "no entrenados", lo que podría estar directamente relacionado con la mayor carga soportada, mayor frecuencia cardíaca alcanzada y tiempo hasta la extenuación.



Gráfica 11. Modificaciones del lactato plasmático en el test de esfuerzo máximo. (* $p < 0,05$ en comparación "no entrenados" y "entrenados"; ** $p < 0,01$ en comparación "inicial" y "final").



Gráfica 12. Modificaciones del lactato plasmático en el test de esfuerzo estable. (** $p < 0,01$ en comparación "inicial" y "final").

En la figura 12, se muestran los niveles de lactato plasmático obtenidos en la prueba de esfuerzo de estado estable. Observamos, en ambos grupos, incrementos respecto a los valores de reposo estadísticamente significativos ($p < 0,001$), a pesar que en los sujetos entrenados se partía con niveles de reposos inferiores. Los valores de lactato finales estaban muy próximos a 4 mmol/L.

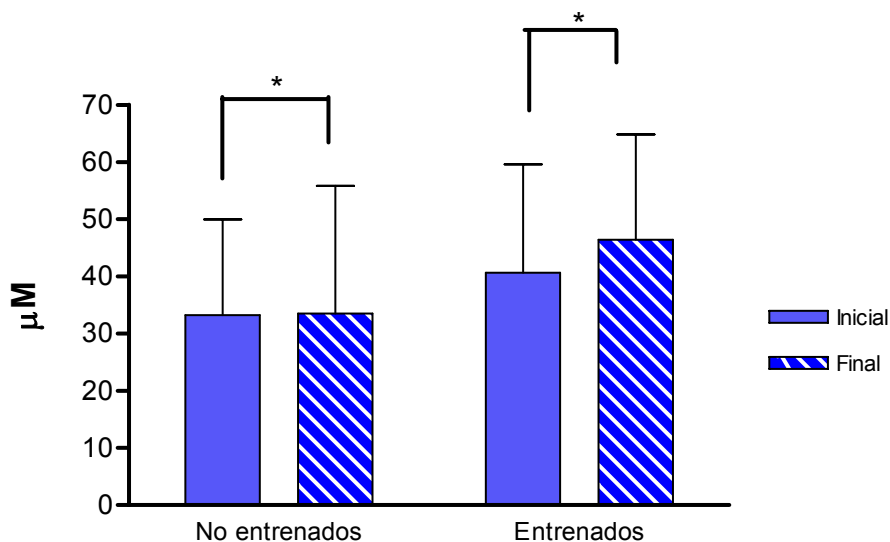
La intensidad del ejercicio, en torno a un 80% del VO_2 máximo, muy próximo al umbral anaeróbico, y la duración de la actividad (30 minutos), podría explicar el incremento de los niveles de lactato tras el esfuerzo, puesto que es una zona en la que existe un equilibrio entre la producción y el aclaramiento del mismo, muy cerca de la zona de acumulación. Quizá, a esa intensidad de esfuerzo, la duración sería determinante para alcanzar la zona de acumulación de lactato.

Por circunstancias experimentales, no disponemos de los valores de lactato eritrocitarios en sujetos entrenados.

4.2.2 Peroxidación lipídica

4.2.2.1 Malondialdehido

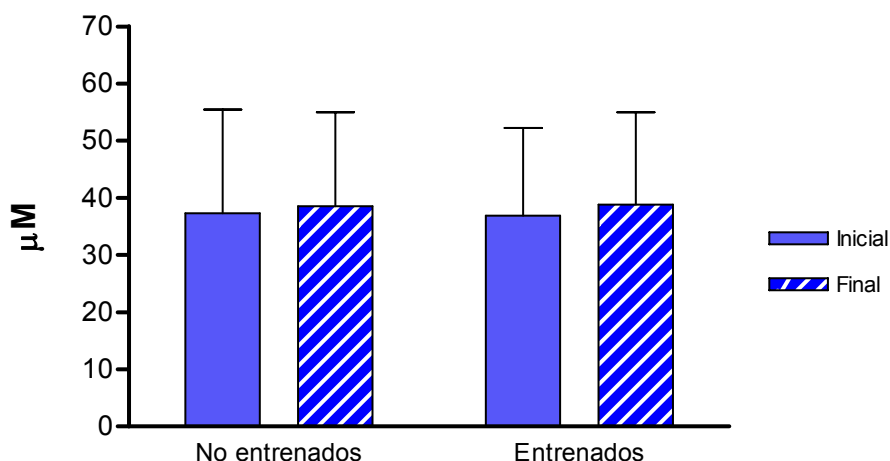
En las gráficas 13 a 16, mostramos los valores obtenidos en MDA plasmático en sujetos “no entrenados” y sujetos “entrenados”, tanto en la prueba de esfuerzo máxima como en la de estado estable, así como los valores de MDA eritrocitario en sujetos “entrenados”, y las diferencias existentes con el plasma.



Gráfica 13. Modificaciones del MDA plasmático en el test de esfuerzo máximo. (* $p < 0,05$, en comparación “inicial” y “final”).

Observamos como en ambos grupos se produce un incremento en los niveles de MDA plasmático, estadísticamente significativo ($p < 0,05$), tras las realización del esfuerzo

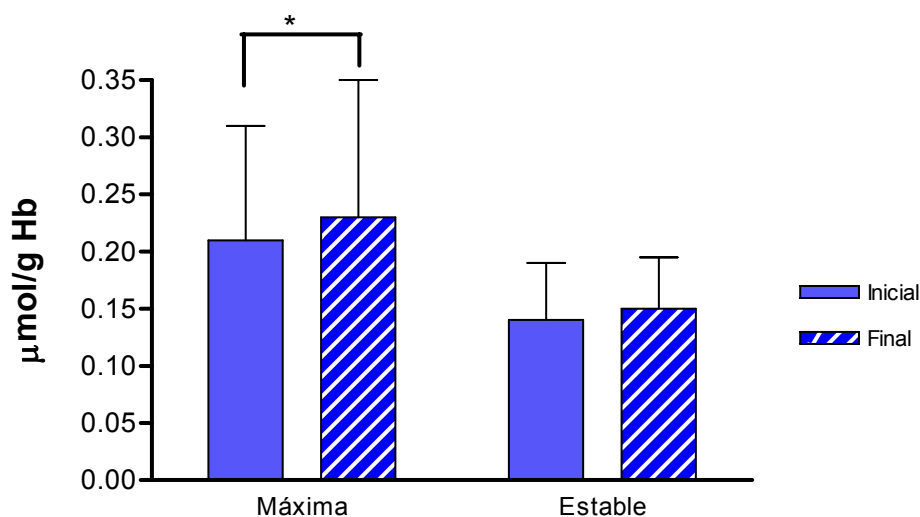
hasta el agotamiento. Los niveles y los cambios producidos en el grupo de “entrenados” fueron ligeramente superiores que en el grupo de “no entrenados”, sin llegar a ser estadísticamente significativa esta diferencia.



Gráfica 14. Modificaciones del MDA plasmático en el test de esfuerzo estable.

En la prueba de esfuerzo submáxima, observamos cambios similares en ambos grupos, produciéndose un ligero aumento en los niveles de MDA, cambio que no alcanzó la significación estadística en ninguno de los 2 grupos. Si observamos en la figura 14, los niveles basales de MDA en sujetos “no entrenados”, son mayores que en la prueba máxima, quizá debido a que el tiempo que transcurrió entre la ambas pruebas no fue suficiente para volver a valores basales. Sin embargo, en sujetos “entrenados”, los niveles basales en las pruebas de esfuerzo eran similares.

En la gráfica 15 presentamos los resultados obtenidos en MDA eritrocitario en ambas pruebas de esfuerzo, en sujetos entrenados. En el esfuerzo hasta el agotamiento se produjo un incremento significativo tras el esfuerzo ($p < 0,05$), mientras que en la prueba submáxima prácticamente no se produjeron cambios al finalizar la prueba, observando una tendencia al incremento, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.



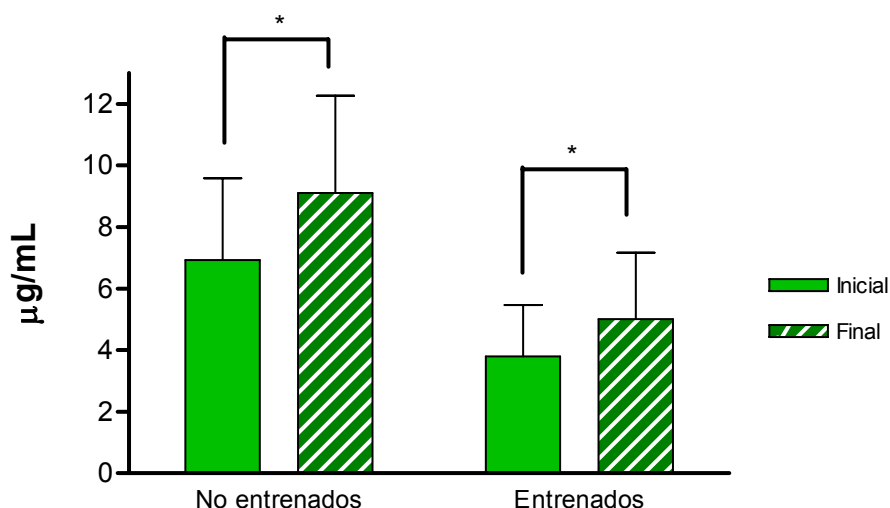
Gráfica 15. Niveles de MDA eritrocitario en el test de esfuerzo máximo y estable en sujetos entrenados. (* $p < 0,05$, en comparación "inicial" y "final").

4.2.3 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Los resultados que a continuación expresamos hacen referencia a los sistemas antioxidantes no enzimáticos, tanto hidrosolubles (vitamina C), como liposolubles (vitamina E, A), expresados en $\mu\text{g} / \text{mL}$.

4.2.3.1 Vitamina C

A continuación mostramos los resultados obtenidos en vitamina C plasmática, en la prueba esfuerzo máximo y estable, en sujetos "entrenados" y "no entrenados", así como los obtenidos en eritrocitos en sujetos "entrenados", en ambas situaciones de esfuerzo.

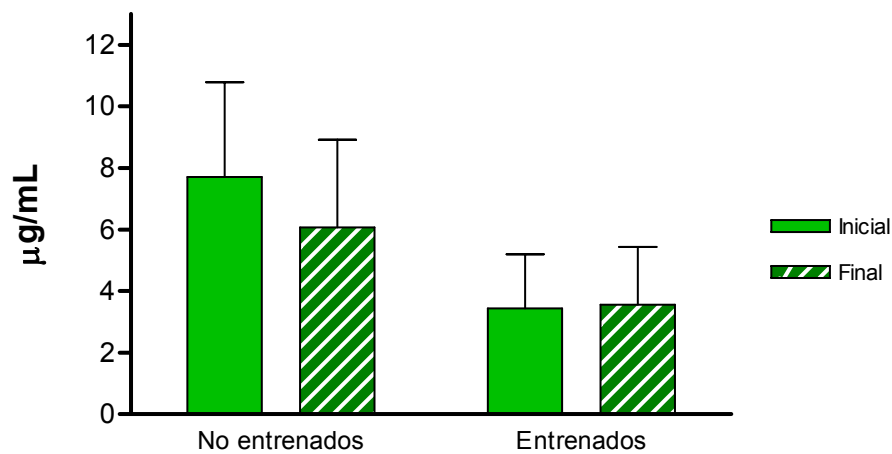


Gráfica 17. Modificaciones de Vitamina C plasmática en el test de esfuerzo máximo. (* $p < 0,05$, en comparación "inicial" y "final").

En ambos grupos se produjo un incremento en vitamina C plasmática, siendo mayores los valores obtenidos en sujetos "no entrenados", tanto antes como después del ejercicio. Además, el incremento después del esfuerzo también fue superior en sujetos "no entrenados" ($p < 0,05$).

Los cambios producidos en la vitamina C plasmática en la prueba de esfuerzo estable se muestran en la gráfica 18. Podemos observar un descenso en los niveles plasmáticos de esta vitamina en sujetos "no entrenados", mientras que en el grupo de "entrenados" observamos, al igual que en la prueba de esfuerzo máxima una pequeña elevación tras la realización del esfuerzo.

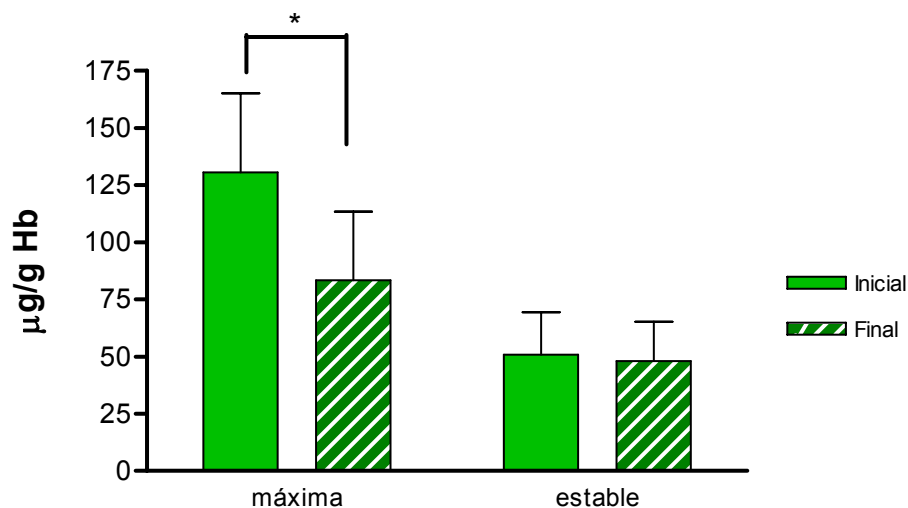
Ninguno de los cambios observados fue estadísticamente significativo. Igualmente podemos observar los menores niveles plasmáticos de vitamina C en sujetos "entrenados", comparados con sujetos "no entrenados", tanto antes como después de la actividad.



Gráfica 18. Modificaciones de Vitamina C plasmática en el test de esfuerzo estable.

En la gráfica 19, se muestran los valores obtenidos en eritrocitos, en sujetos entrenados, tras la realización de ambos esfuerzos. Podemos observar, a diferencia de lo que ocurría en plasma, como los niveles en eritrocito caen tras el esfuerzo, siendo una caída estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

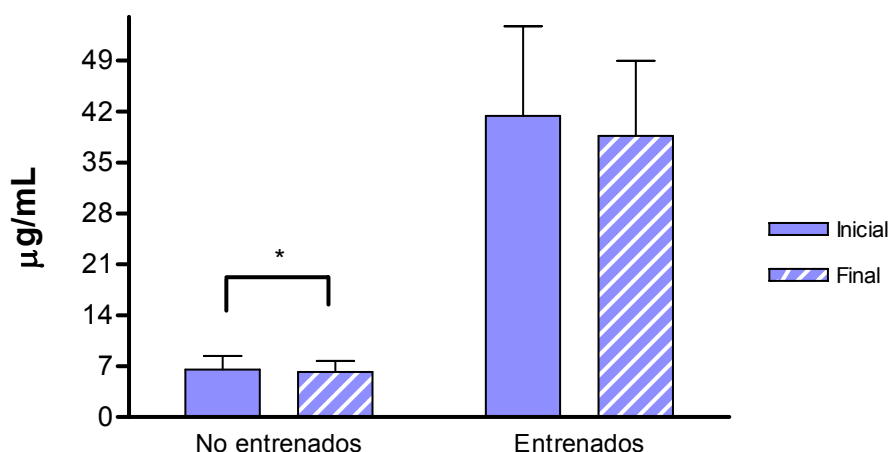
Si observamos los cambios producidos en la prueba de esfuerzo submáxima, no existen apenas modificaciones entre antes y después de la prueba. Una ligera tendencia al descenso sin llegar a ser estadísticamente significativa.



Gráfica 19. Niveles de vitamina C eritrocitaria en el test de esfuerzo máxima y estable en sujetos entrenados. (* $p < 0,05$, en comparación "inicial" y "final").

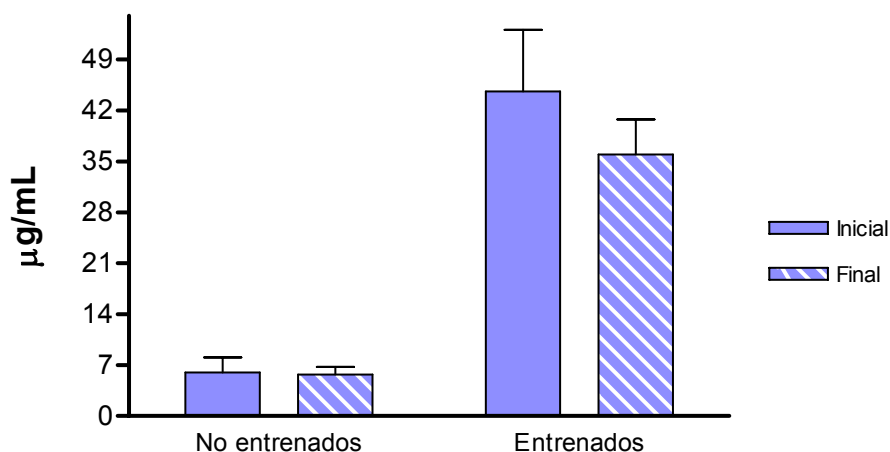
4.2.3.2 Vitamina E

En las gráficas 20 a 22 mostramos los resultados obtenidos en Vitamina E, antioxidante soluble en medios lipídicos, y su comportamiento relacionado con el tipo de esfuerzo sometido a los sujetos, tanto “entrenados” como “no entrenados”. Por otra parte, observamos también los resultados obtenidos en eritrocitos en el grupo de “entrenados”.



Gráfica 20. Modificaciones de Vitamina E plasmática en el test de esfuerzo máximo. (* $p < 0,05$, en comparación “inicial” y “final”).

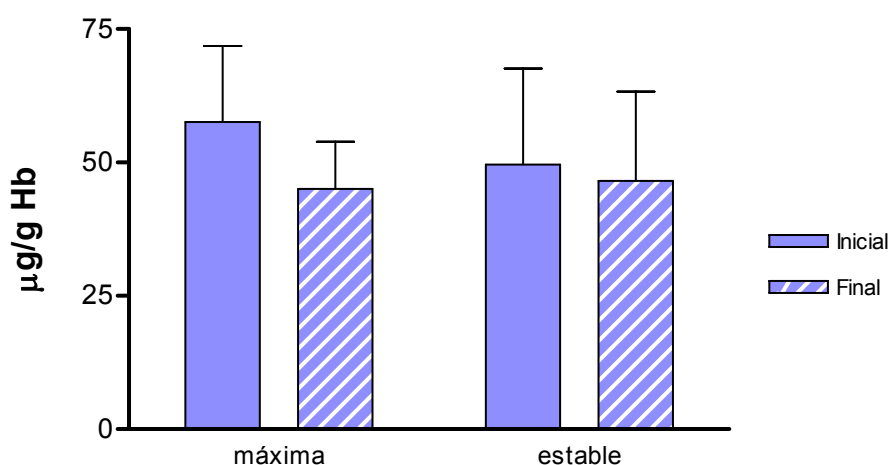
Podemos observar, en el esfuerzo máximo, como se produjo un descenso en los niveles de vitamina E, en ambos grupos, siendo estadísticamente significativo en el grupo de “no entrenados” ($p < 0,05$). También podemos ver como los niveles plasmáticos de esta sustancia son marcadamente superiores en el grupo de “entrenados”.



Gráfica 21. Modificaciones de Vitamina E plasmática en el test de esfuerzo estable.

En la prueba de esfuerzo estable, observamos como en ambos grupos se produjo un descenso en los niveles de vitamina E tras el esfuerzo, siendo mayor el descenso en los sujetos “entrenados”. Por otro lado, éstos presentaban niveles plasmáticos más elevados de esta vitamina.

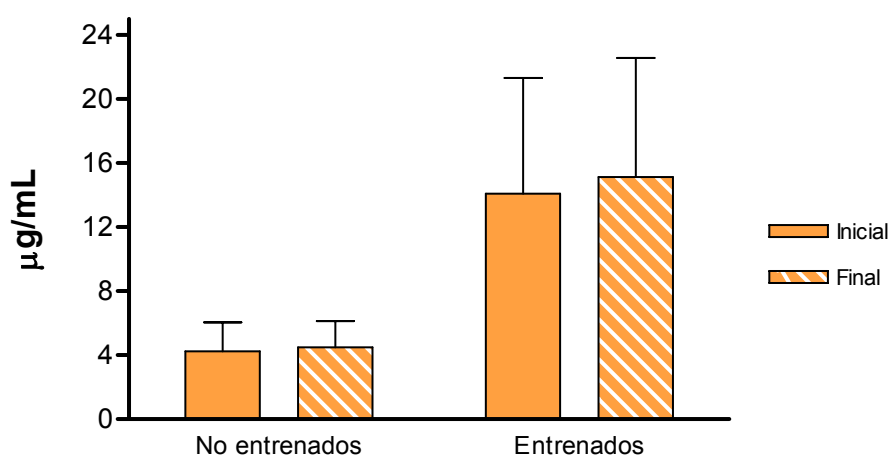
En la gráfica 22 mostramos los valores obtenidos en vitamina E en eritrocito en ambas pruebas de esfuerzo. El comportamiento de la vitamina E, en sujetos “entrenados”, en eritrocito fue similar al plasma. En ambos esfuerzos se produjo un descenso en los niveles de vitamina E, no llegando a ser estadísticamente significativo en ninguno de ellos. En cualquier caso, podemos observar un mayor descenso en esta vitamina tras el esfuerzo hasta el agotamiento que en la prueba submáxima de mayor duración.



Gráfica 22. Niveles de vitamina E eritrocitaria en el test de esfuerzo máximo y estable en sujetos entrenados.

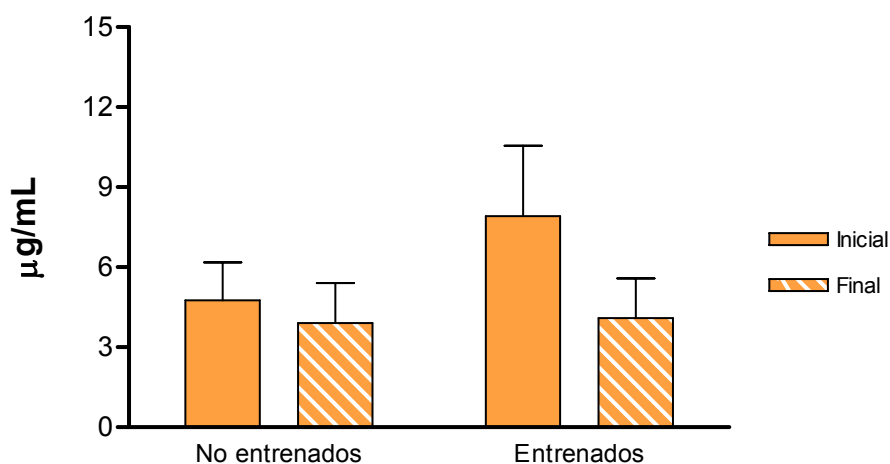
4.2.3.3 Vitamina A

En las gráficas 23 a 25 mostramos los resultados obtenidos en Vitamina A, antioxidante soluble en medios lipídicos, como la vitamina E, y su comportamiento relacionado con el tipo de esfuerzo sometido a los sujetos, tanto “entrenados” como “no entrenados”. Por otra parte, observamos también los resultados obtenidos en eritrocitos en el grupo de “entrenados”.



Gráfica 23. Modificaciones de Vitamina A plasmática en el test de esfuerzo máximo.

Los cambios plasmáticos producidos en esta sustancia, tanto en el grupo de “entrenados” como en el de “no entrenados” fue similar. En ambos grupos se produjo un incremento de los niveles tras el esfuerzo hasta el agotamiento, no llegando a ser estadísticamente significativa dicha modificación. Respecto a los niveles obtenidos, observamos que el grupo de “entrenados” presentaba niveles mayores de esta vitamina a nivel plasmático.

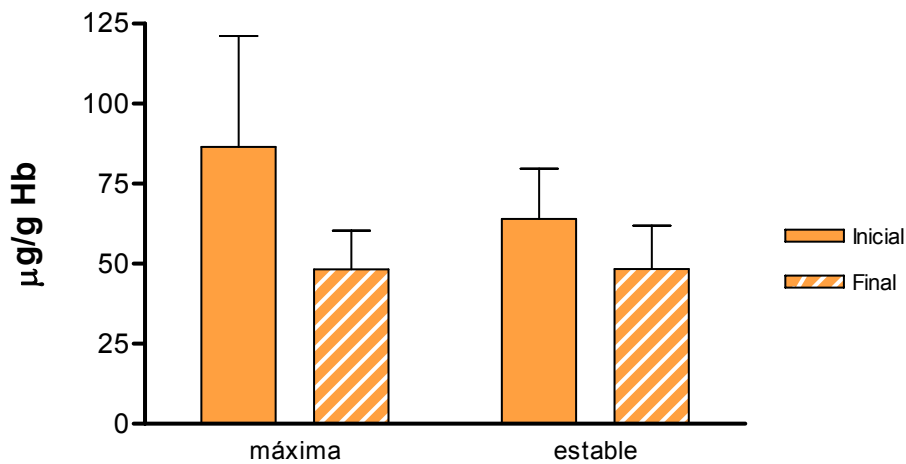


Gráfica 24. Modificaciones de Vitamina A plasmática en el test de esfuerzo estable.

En la prueba de esfuerzo submáximo, de estado estable, los cambios observados en vitamina A fueron diferentes a la prueba de esfuerzo máximo. En este sentido, en ambos grupos observamos un descenso de la misma tras la realización del esfuerzo, sin

llegar a ser estadísticamente significativo. Los niveles basales observados en el grupo de “entrenados” son superiores a los niveles del grupo de “no entrenados”. Sin embargo, al final del esfuerzo, ambos grupos presentaban datos muy similares. El mayor descenso se produjo en el grupo de “entrenados”.

En la gráfica 25 se muestran las modificaciones sufridas por la vitamina A, en eritrocitos, en sujetos entrenados, tras el esfuerzo máximo y submáximo. Tal y como vemos, en ambos esfuerzos se produce un descenso en los niveles eritrocitarios de esta sustancia, siendo más acentuado, tal y como ocurría con la vitamina E, en el esfuerzo de mayor intensidad.



Gráfica 25. Niveles de vitamina A eritrocitaria en el test de esfuerzo máximo y estable en sujetos entrenados.

4.3 VALORACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN ORINA

Los resultados que vamos a mostrar a continuación, corresponden al grupo de sujetos entrenados, sometidos a esfuerzos diferentes, en laboratorio. Las orinas recogidas antes y después del esfuerzo muestran las modificaciones obtenidas en los diferentes parámetros hormonales que iremos analizando uno a uno. Los esfuerzos realizados por los sujetos son los siguientes:

- Esfuerzo máximo: pruebas de laboratorio ergoespirométricas, incremental hasta el agotamiento.
- Esfuerzo estable: pruebas de laboratorio de estado estable al 80% del VO_2 máx.

Mostraremos los resultados de los siguientes parámetros:

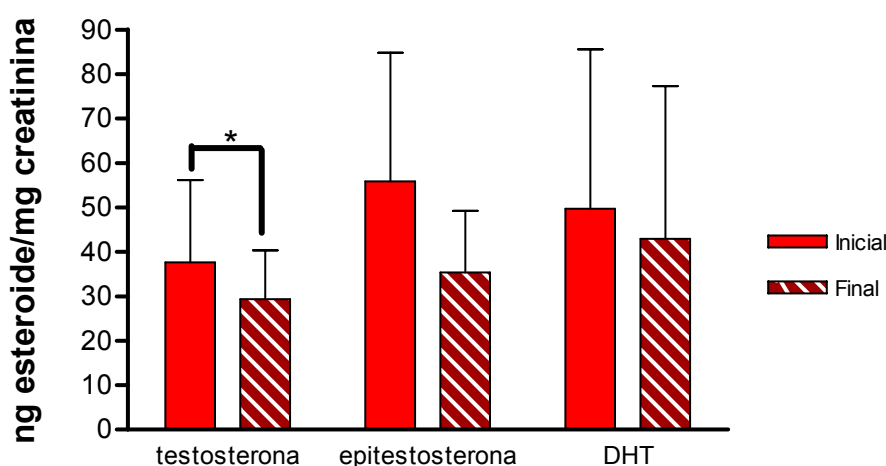
- Andrógenos testiculares: testosterona, epitestosterona, androsterona, etiolanolona, DHT y andrógenos testiculares totales.
- Andrógenos suprarrenales: DHEA, androstenodiona y andrógenos suprarrenales totales
- Corticosteroides: tetrahydrocortisona, tetrahydrocortisol, cortisona y cortisol.
- Estrógenos: β -estradiol y estrona
- Relación anabolismo/catabolismo: relaciones andrógenos testiculares/corticosteroides y andrógenos suprarrenales/corticosteroides.
- Actividad enzimática y aromatización: etiolanolona/androsterona, DHT/Testosterona, androstenodiona/testosterona, estrona/androstenodiona, β -estradiol/testosterona.

Los valores están expresados en ng esteroide/mg creatinina.

4.3.1 Valoración de andrógenos testiculares

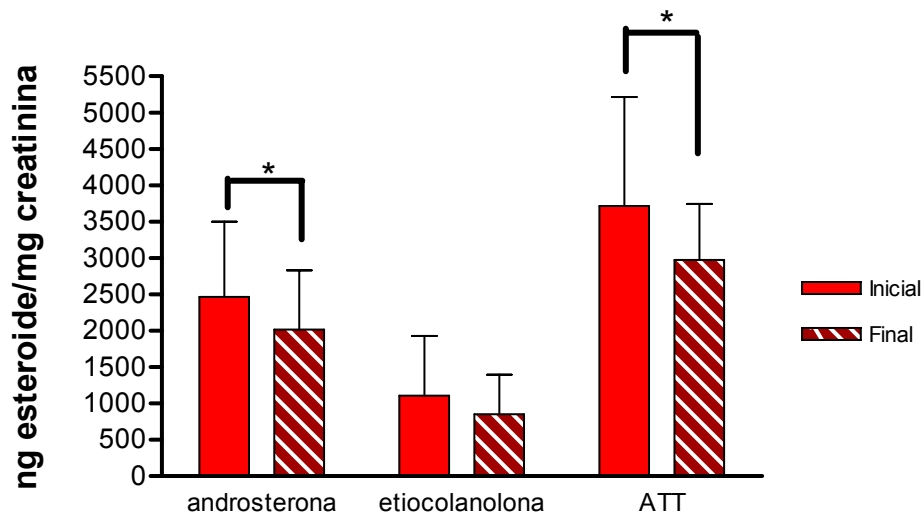
En las gráficas 26 a 29, presentamos los resultados obtenidos en andrógenos testiculares, tanto en la prueba de esfuerzo máxima como en la de estado estable.

En la gráfica 26 podemos observar los cambios encontrados en testosterona, epitestosterona y DHT, encontrando descensos en todos los valores una vez referidos a la creatinina, alcanzando la significación estadística en el caso de la testosterona.



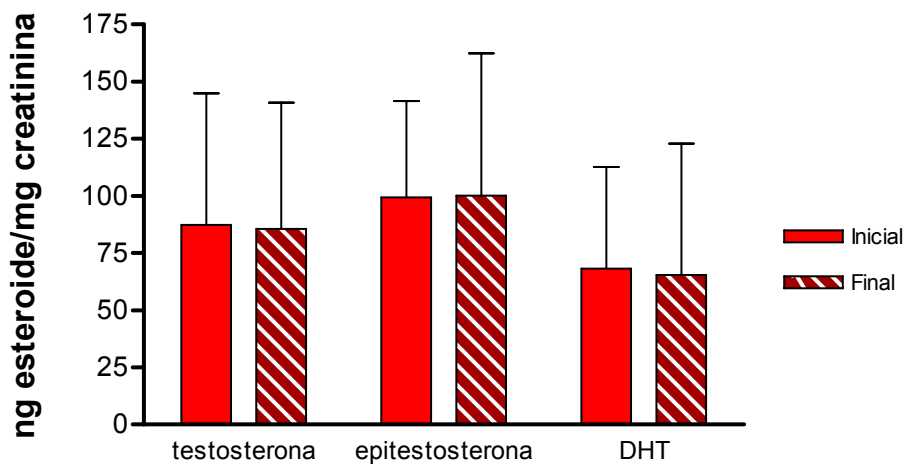
Gráfica 26. Niveles de testosterona, epitestosterona y DHT en el test de esfuerzo máximo. (* $p < 0,05$ en comparación "inicial" y "final").

En la siguiente gráfica se presentan los niveles de androsterona, eticolanolona y andrógenos testiculares totales, antes y después de la prueba de esfuerzo máxima. Tras la realización del esfuerzo, descienden los niveles de todos los parámetros, de forma que llegan a ser estadísticamente significativos en el caso de la androsterona y los andrógenos testiculares totales ($p < 0,05$).

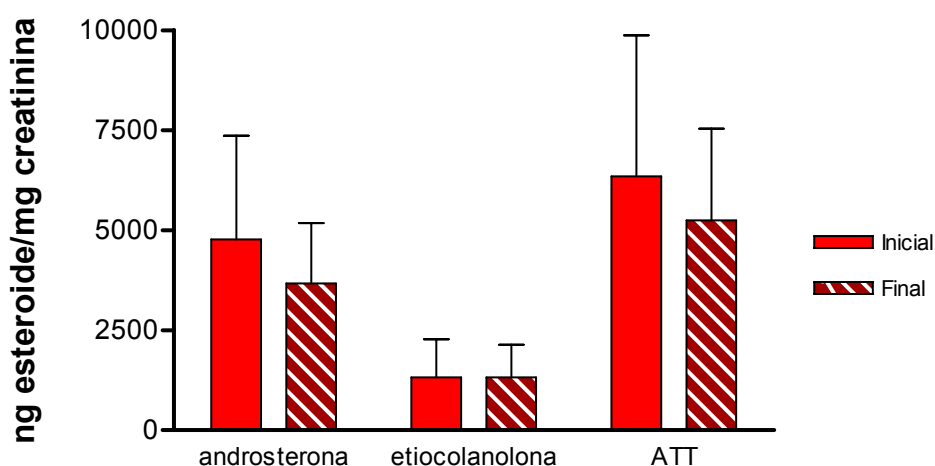


Gráfica 27. Niveles de androsterona, eticolanolona, y andrógenos testiculares totales (ATT) en el test de esfuerzo máximo. (* $p < 0,05$ en comparación "inicial" y "final").

Con respecto a la prueba de esfuerzo estable, los datos encontrados muestran también descensos en todos los valores, tal y como se muestra en las gráficas 28 y 29, sin llegar a ser estadísticamente significativos.



Gráfica 28. Niveles de testosterona, epitestosterona y DHT en el test de esfuerzo estable.



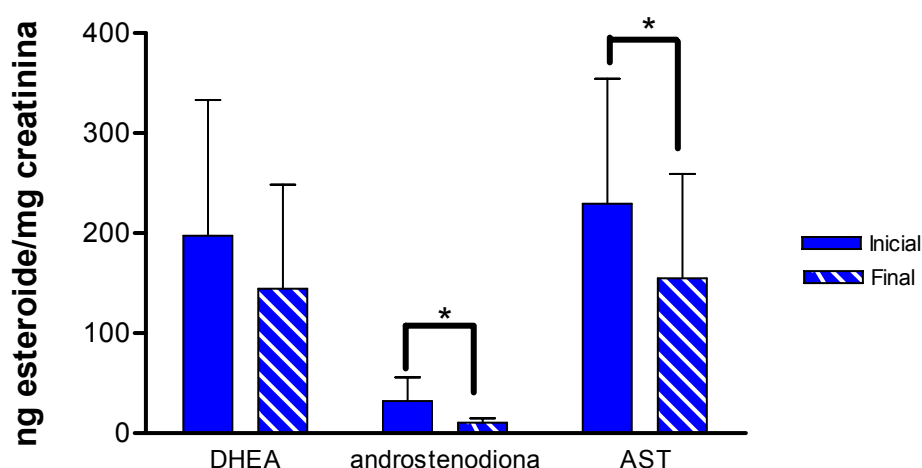
Gráfica 29. Niveles de androsterona, eticolanolona, y andrógenos testiculares totales (ATT) en el test de esfuerzo estable.

Un aspecto importante a destacar son los valores iniciales encontrados en la prueba de esfuerzo submáxima. Observamos como todos los valores son superiores a los valores basales obtenidos en la prueba de esfuerzo máxima, pero en general, podemos observar como existen descensos en los niveles urinarios de andrógenos testiculares tras la realización de un esfuerzo de carácter máximo así como de carácter submáximo al 80% del VO_2 máximo, siendo más acentuados en la prueba de esfuerzo máxima hasta el agotamiento, quizá debido a la intensidad del esfuerzo, aunque analizaremos más estas modificaciones en el apartado de discusión.

4.3.2 Valoración de andrógenos suprarrenales

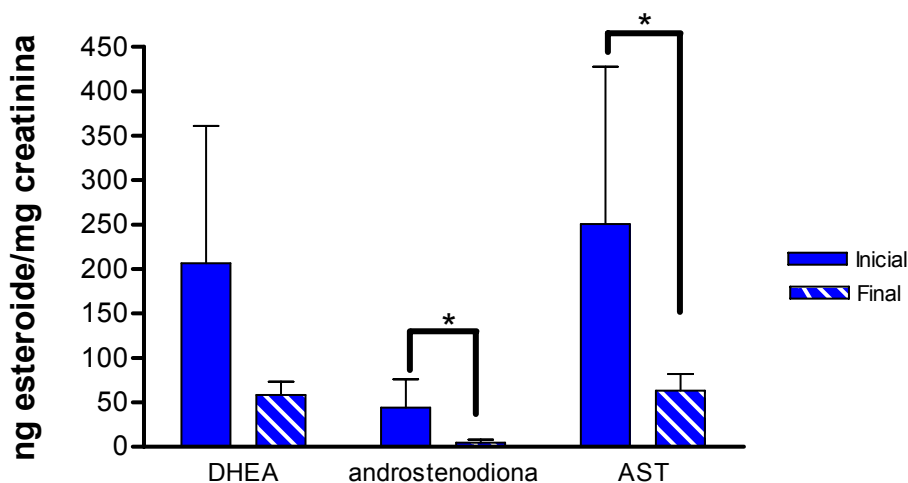
A continuación presentamos los datos obtenidos en los niveles de andrógenos suprarrenales tras la realización de un esfuerzo máximo hasta el agotamiento y otro de carácter submáximo, con valores expresado en ng esteroide/mg creatinina.

En este sentido, en la gráfica 30 encontramos los valores obtenidos en DHEA, androstenediona y andrógenos suprarrenales totales tras la realización del esfuerzo máximo. Como podemos observar, existe un descenso en todos los parámetros, existiendo diferencias significativas en androstenediona y andrógenos suprarrenales totales.



Gráfica 30. Niveles de DHEA, androstenediona y andrógenos suprarrenales totales (AST) en el test de esfuerzo máximo. (* $p < 0,05$ en comparación "inicial" y "final").

En la gráfica 31 se muestran las modificaciones obtenidas en DHEA, androstenediona y en andrógenos suprarrenales totales en la prueba submáxima, encontrando descensos después de la realización del ejercicio. El descenso obtenido en androstenediona alcanzó la significación estadística, así como en andrógenos suprarrenales totales. Los cambios obtenidos en DHEA son algo más acusados que en la prueba máxima.



Gráfica 31. Niveles de DHEA, androstenediona y andrógenos suprarrenales totales (AST) en el test de esfuerzo estable. (* $p < 0,05$ en comparación "inicial" y "final").

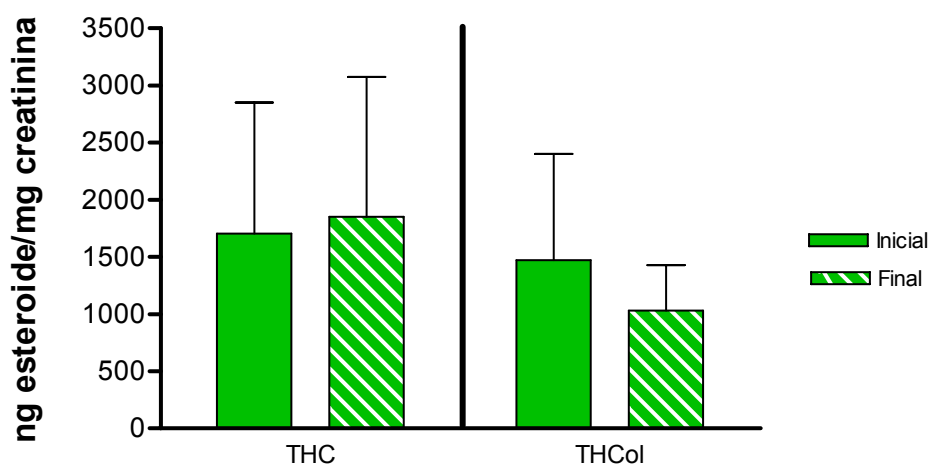
Podemos observar, en este caso, como los valores iniciales de la prueba submáxima son similares a los obtenidos en la prueba de esfuerzo máxima, aunque estos datos los analizaremos en el apartado de discusión

4.3.3 Valoración de corticosteroides

Los resultados obtenidos en corticosteroides, tanto en la prueba máxima como en la de estado estable, se muestran en las gráficas 32 a 36. Los resultados son expresados en ng esteroide/mg creatinina, y hacen referencia a los siguientes parámetros:

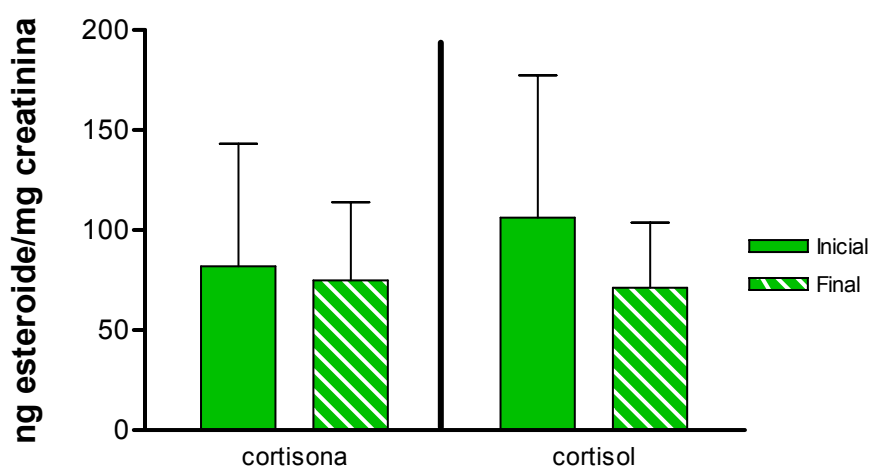
- Tetrahidrocortisona: THC
- Tetrahidrocortisol: THCoI
- Cortisona
- Cortisol
- Corticosteroides totales (CT)

Observamos en la gráfica 32, los cambios producidos en THC y THCoI en la prueba de esfuerzo máxima. Los niveles de THC aumentan tras el esfuerzo, mientras que los de THCoI descienden, sin llegar a la significación estadística en ninguno de los casos.



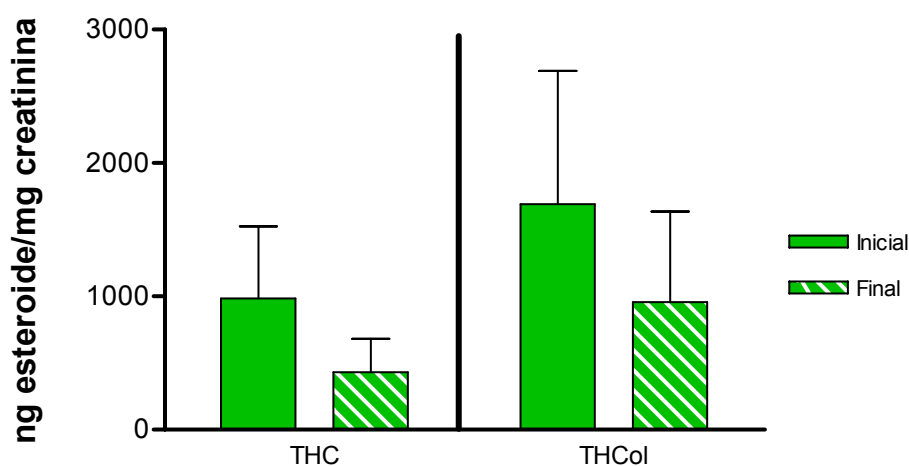
Gráfica 32. Niveles de THC y THCoI en el test de esfuerzo máximo.

A continuación (gráfica 33), encontramos una tendencia similar de los parámetros de cortisona y cortisol, cuyos niveles descienden en orina tras la realización del esfuerzo, no encontrando cambios significativos en estas modificaciones. Cabe destacar que los descensos encontrados son bastante inferiores a los obtenidos en andrógenos, tanto testiculares como suprarrenales.



Gráfica 33. Niveles de cortisona y cortisol en el test de esfuerzo máximo.

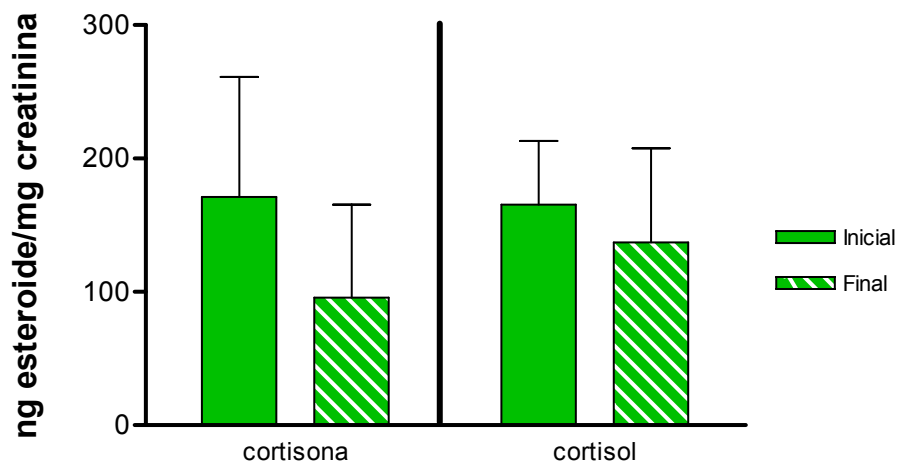
En las siguientes gráficas (34 y 35) presentamos los valores obtenidos en THC, THCol, cortisona y cortisol en la prueba submáxima al 80% del VO_2 máximo.



Gráfica 34. Niveles de THC y THCol en el esfuerzo estable.

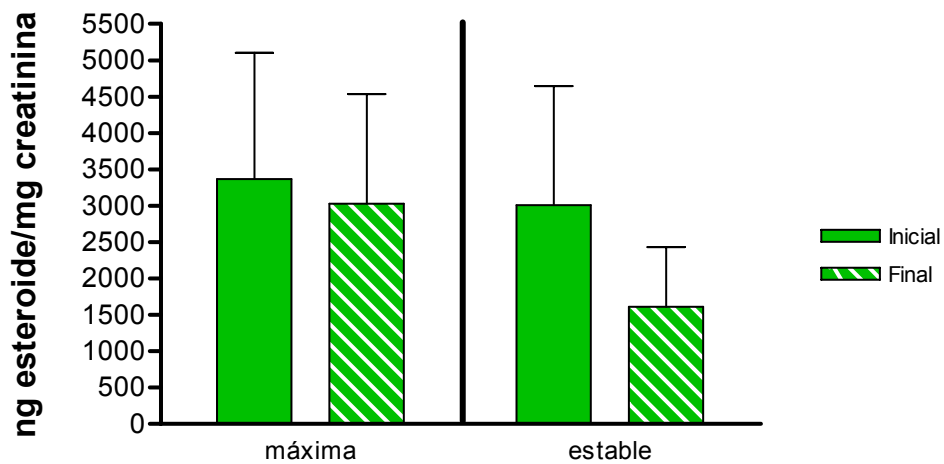
Como podemos ver, se produce un descenso en los niveles de THC y THCol tras la prueba submáxima, cercanos a la significación estadística, pero sin llegar a ella en ninguno de los casos.

Las modificaciones observadas en cortisona siguen la misma tendencia que los parámetros anteriores, mientras que los niveles de cortisol permanecen prácticamente invariables tras la realización de 30 minutos de esfuerzo por debajo de umbral anaeróbico. Los niveles basales de cortisona y cortisol en la prueba submáxima son mayores que los niveles iniciales encontrados en la prueba de esfuerzo máxima.



Gráfica 35. Niveles de cortisona y cortisol en el test de esfuerzo estable.

A continuación se observan los cambios obtenidos en los niveles de corticosteroides totales, tanto en la prueba de esfuerzo incremental máxima como en la prueba al 80% del VO_2 máximo. En ambos casos observamos descensos en los niveles urinarios de corticosteroides totales, siendo más acentuada la caída en el caso del esfuerzo submáximo (gráfica 36).

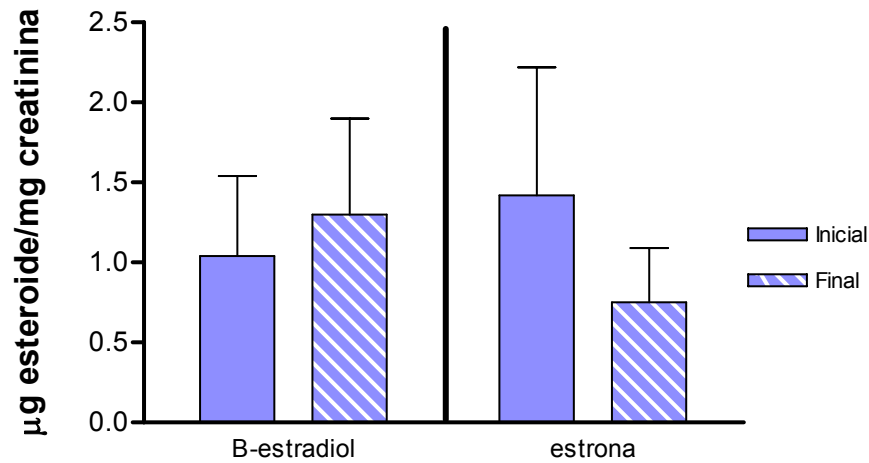


Gráfica 36. Niveles de corticosteroides totales (CT) en el test de esfuerzo máximo y estable.

4.3.4 Valoración de estrógenos

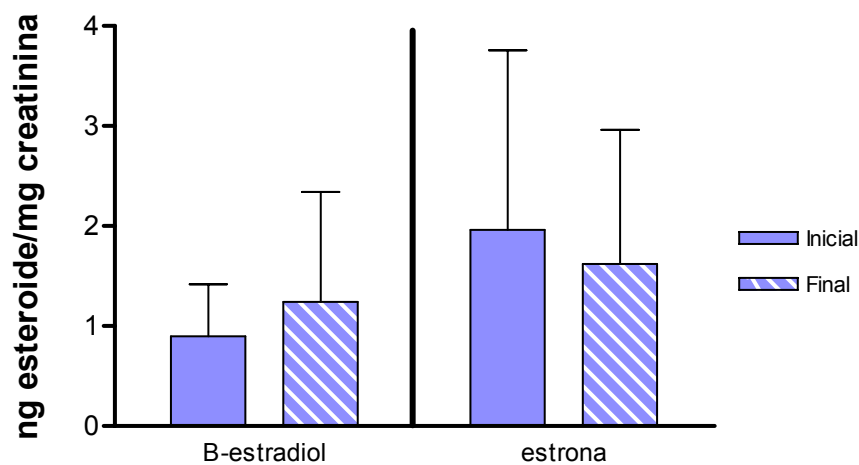
En las siguientes gráficas presentamos los resultados obtenidos en β -estradiol y en estrona, antes y después de realizar los diferentes esfuerzos planteados.

En este sentido, en la prueba de esfuerzo de carácter máximo, hasta el agotamiento, encontramos respuestas diferentes de ambos parámetros, observando elevaciones en β -estradiol y descensos en estrona (gráfica 37), sin llegar a la significación estadística.



Gráfica 37. Niveles de β -estradiol y estrona en el test de esfuerzo máximo.

Por su parte, en la prueba de esfuerzo submáxima, encontramos la misma tendencia en cada uno de los parámetros, tal y como aparece reflejado en la gráfica 38. En ninguno de los casos, el descenso es estadísticamente significativo.



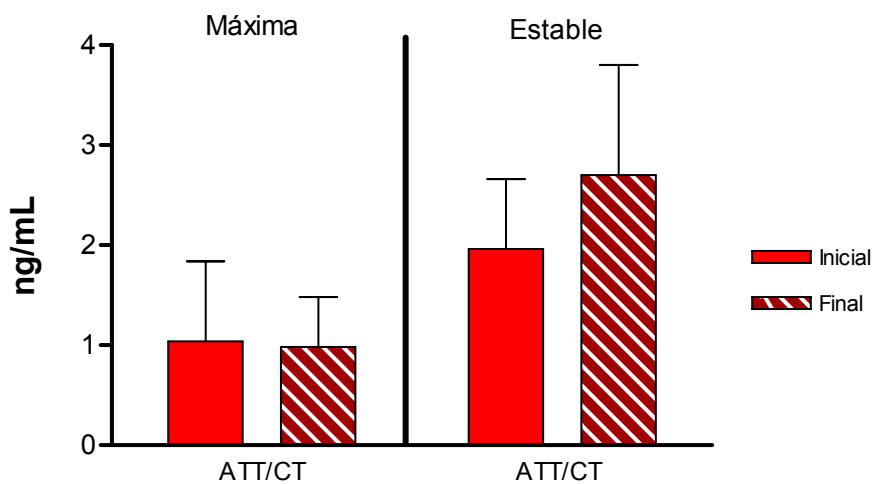
Gráfica 38. Niveles de β -estradiol y estrona en el test de esfuerzo estable.

4.3.5 Relaciones anabolismo / catabolismo y actividad enzimática

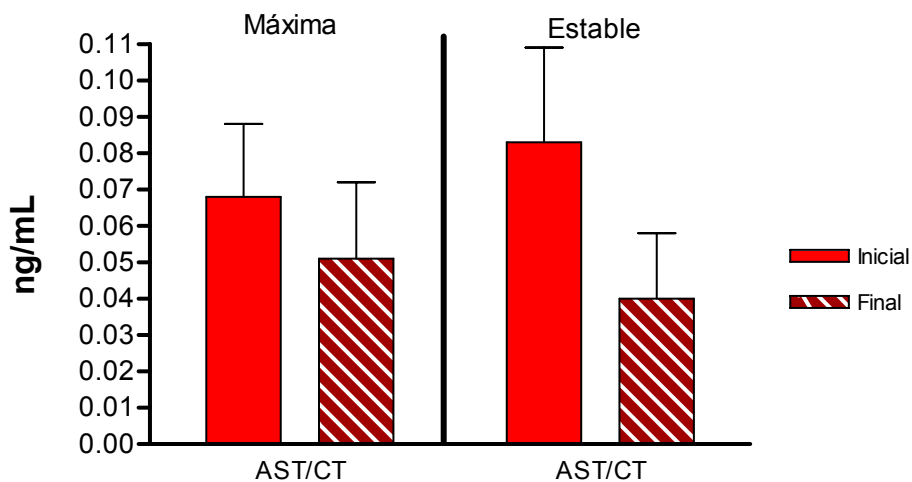
A continuación presentamos las relaciones establecidas para determinar el grado de anabolismo y catabolismo que provocan los diferentes tipos de esfuerzos, así como la actividad de determinadas enzimas relacionadas con la conversión de andrógenos a estrógenos.

En este sentido, presentamos las siguientes relaciones:

- Relaciones andrógenos testiculares totales / corticosteroides totales y andrógenos suprarrenales totales / corticosteroides totales, para determinar qué marcador es más adecuado para establecer el grado de anabolismo o catabolismo que genera el esfuerzo.
- Relaciones T/THC, T/THCoI, DHEA/THC y DHEA/THCoI, para determinar grado de anabolismo / catabolismo, con diferentes orígenes en los andrógenos.
- Actividad de la enzima 5 α – reductasa: mediante las relaciones entre los metabolitos de la testosterona, como son la eticolanona / androsterona, así como la relación DHT / T, acciones catalizadas por dicha enzima (Poor *et al.*, 2002).
- Aromatización, mediante las relaciones estrona /androstendiona, y β -estradiol / T, reacciones de conversión en las que intervienen las aromatasas.



Gráfica 39. Relación andrógenos testiculares totales / corticosteroides totales en el test de esfuerzo máximo y estable.

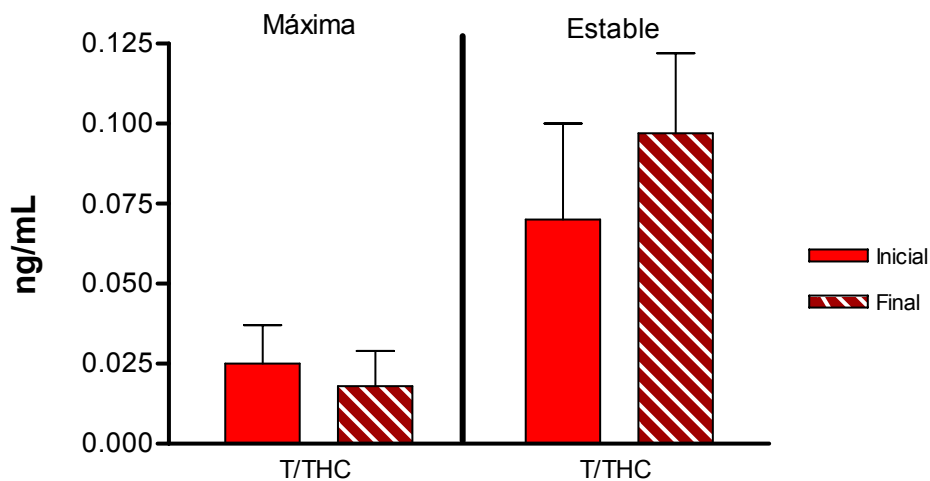


Gráfica 40. Relación andrógenos suprarrenales totales / corticosteroides totales en el test de esfuerzo máximo y estable.

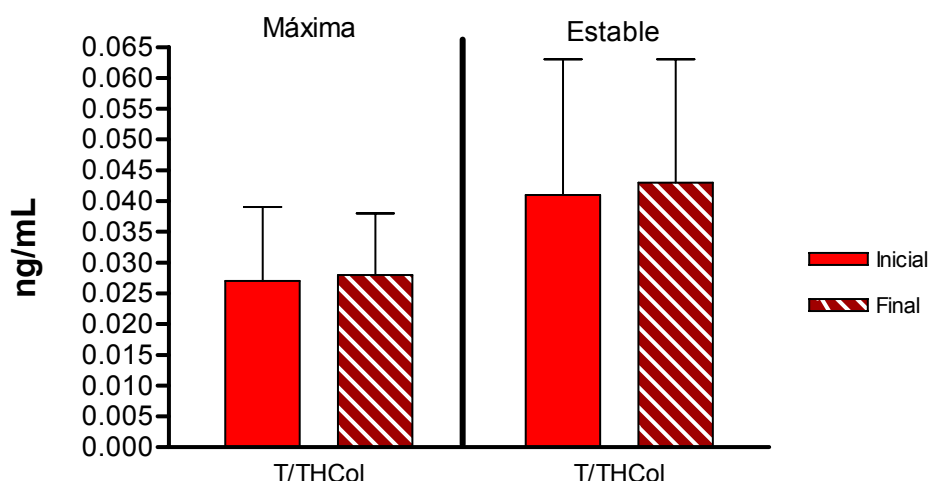
En las gráficas 39 y 40 observamos los diferentes comportamientos de la relación existente entre los andrógenos testiculares y suprarrenales con respecto a los corticosteroides. Estas relaciones nos muestran el estado de anabolismo o catabolismo que provoca el ejercicio planteado, de forma que los resultados muestran que la prueba de esfuerzo máxima provoca un mayor grado de catabolismo debido al descenso producido en dicha relación. En este sentido, los niveles de andrógenos descienden en mayor medida que los de corticosteroides, por lo que la relación entre ambos desciende, siendo más acentuado este descenso cuando comparamos los andrógenos suprarrenales y corticosteroides. Por su parte, en la prueba de esfuerzo submáxima observamos un incremento en esta relación en el caso de los andrógenos testiculares totales y los corticosteroides,

sin llegar a ser estadísticamente significativa, y un descenso en el caso de andrógenos suprarrenales y corticosteroides que tienden a responder de una forma más constante entre ellos, posiblemente debido a su origen, siendo este descenso menos importante que en la prueba máxima. Los niveles iniciales en la prueba de esfuerzo submáxima son superiores también a los de la prueba máxima, de forma que la mayor caída en la relación observada en la prueba estable es debida fundamentalmente al descenso ocurrido en los metabolitos del cortisol y cortisona, que provocan un mayor descenso en la relación.

Igualmente, en las gráficas siguientes aparecen las relaciones entre el principal andrógeno testicular, como es la testosterona, y suprarrenal, como la DHEA, y los metabolitos de la cortisona y el cortisol, como son la Tetrahydrocortisona (THC) y el Tetrahydrocortisol (THCol).



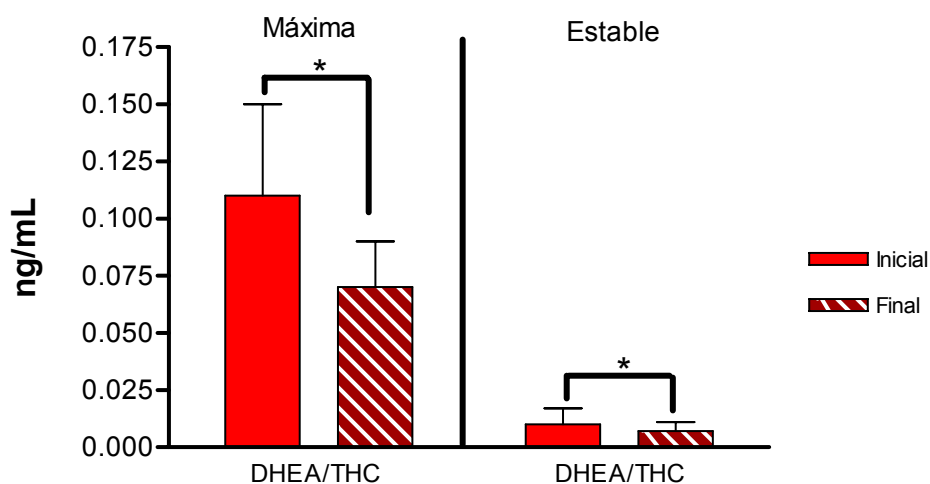
Gráfica 41. Relación T/THC en el test de esfuerzo máximo y estable.



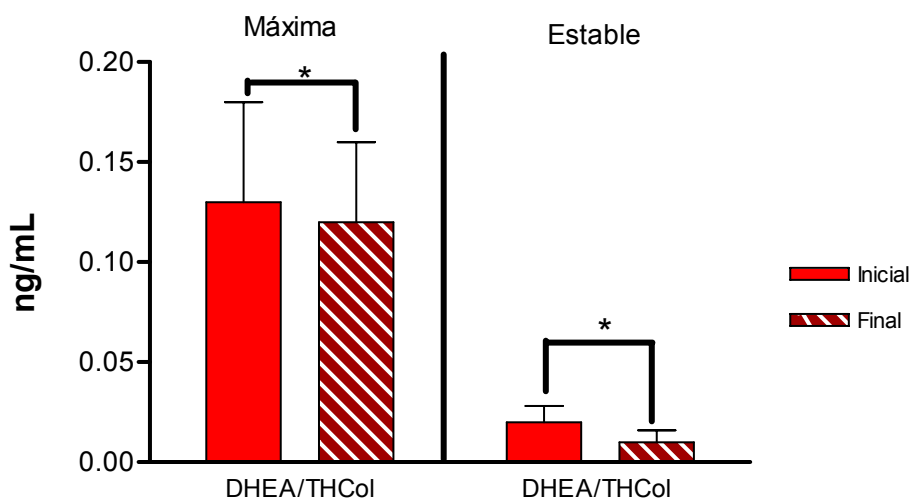
Gráfica 42. Relación T/THCoI en el test de esfuerzo máximo y estable.

En las gráficas 41 y 42 encontramos los resultados que relacionan la T con THC y THCoI, observando una tendencia similar a la encontrada en los andrógenos y corticosteroides totales, es decir, en la prueba de esfuerzo máxima encontramos un descenso en la relación, que indica un mayor estrés o actividad catabólica, mientras que en la prueba de esfuerzo de estado estable al 80% del VO_2 máximo observamos un incremento en la relación, que implican una mayor actividad anabólica o una menor actividad catabólica. En cualquier caso, no hemos encontrado una relación estadísticamente significativa en ninguna tendencia de los parámetros.

Por su parte, la relación entre la DHEA y los corticosteroides aparece reflejada en las gráficas 43 y 44. Al tener un mismo origen, hemos podido observar como la tendencia de los resultados parece ser la misma según el tipo de esfuerzo y el metabolito analizado. De esta forma, parece ser que en los esfuerzos de alta intensidad hasta el agotamiento, existe una mayor respuesta de la THC, la cual provoca que incremente la actividad catabólica del organismo, mientras que en el esfuerzo submáximo, parece ser que afecta más a los niveles de THCoI provocando un descenso en la relación. En cualquier caso, existen diferencias significativas en todos los casos ($p < 0,05$).



Gráfica 43. Relación DHEA/THC en el test de esfuerzo máximo y estable. (* $p < 0,05$ en comparación "inicial" y "final").

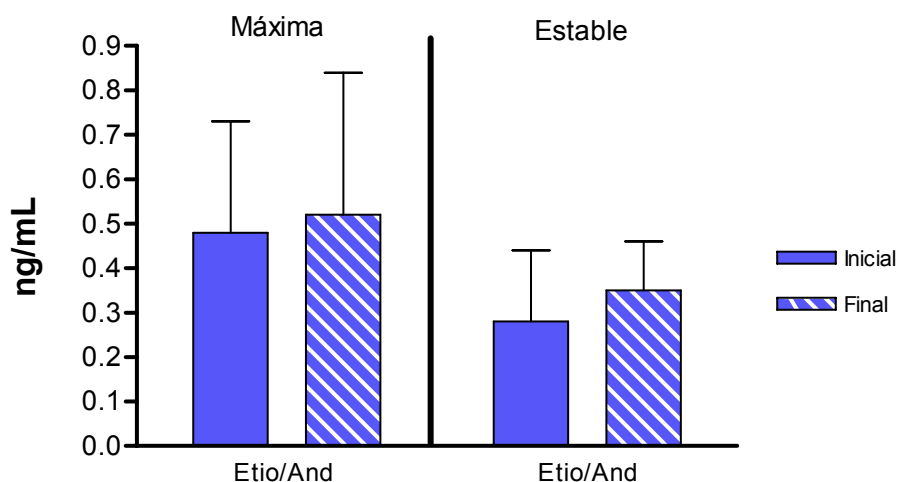


Gráfica 44. Relación DHEA/THCoI en el test de esfuerzo máximo y estable. (* $p < 0,05$ en comparación "inicial" y "final").

Por otra parte, la actividad enzimática relacionada con la 5 α -reductasa, la determinamos a partir de la relación existente entre los metabolitos urinarios de la testosterona, como son la eticolanona y la androsterona, así como con la relación DHT / T.

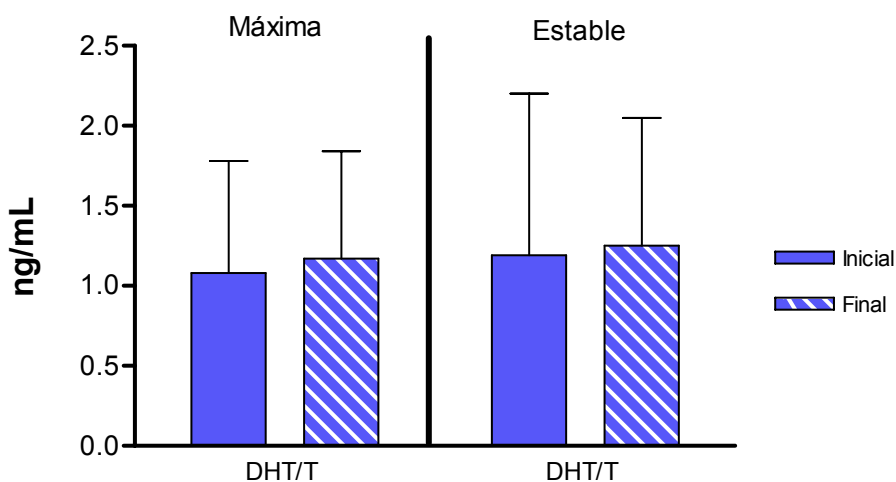
En la gráfica 45 presentamos la relación entre los metabolitos de la testosterona, tanto en la prueba de esfuerzo máximo como en la submáxima al 80% del VO_2 máximo. En ella encontramos como en ambos casos, la tendencia es al incremento de la relación, en este caso por dos motivos diferentes. En la prueba de esfuerzo máximo, ambos metabolitos sufren un descenso, siendo más acentuado el descenso de la androsterona, mientras que en la prueba de estado estable, el aumento en la relación es debido a un des-

censo en la androsterona, mientras que la eticolanolona permanece prácticamente invariable.



Gráfica 45. Relación eticolanolona / androsterona en el test de esfuerzo máximo y estable.

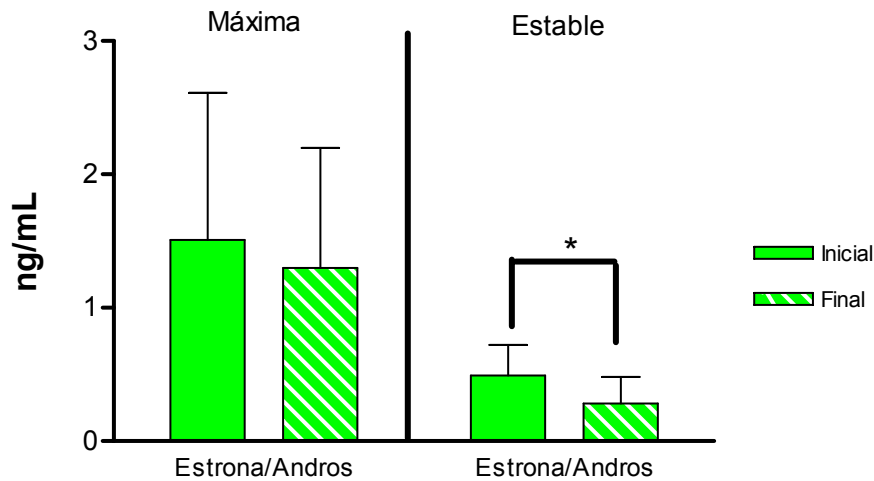
Por otra parte, la relación existente entre la DHT y la T parece diferente en función del tipo de esfuerzo realizado. En este sentido, en la prueba de esfuerzo máxima, la relación entre ambas tiende a subir, aunque este ascenso es debido fundamentalmente a un mayor descenso en los niveles de testosterona tras la realización del esfuerzo. De forma similar ocurre durante la prueba de esfuerzo submáxima de estado estable.



Gráfica 46. Ratio DHT / T en el test de esfuerzo máximo y estable.

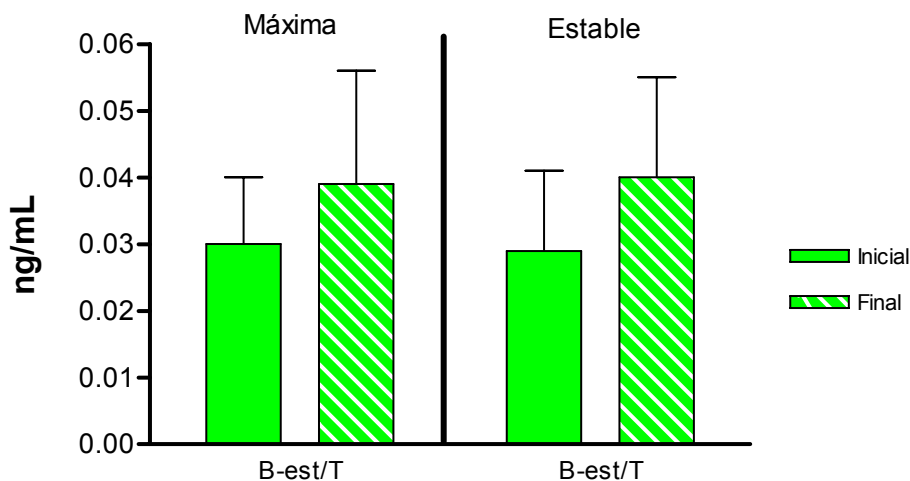
Por último, la actividad de las aromatasas la podemos observar por el grado de transformación de andrógenos a estrógenos. De esta forma, en las gráficas 47 y 48 pre-

sentamos los resultados obtenidos en la relación entre androstenodiona y estrona, y entre testosterona y β -estradiol.



Gráfica 47. Ratio estrona / androstenodiona en el test de esfuerzo máximo y estable. (* $p < 0,05$ en comparación "inicial" y "final").

Con respecto a la relación estrona/androstenodiona, en ambas pruebas de esfuerzo observamos un descenso en la ratio, siendo estadísticamente significativo en la prueba de esfuerzo submáxima ($p < 0,05$). En la prueba de esfuerzo máxima, se produce un descenso en ambos parámetros, aunque es más importante en el caso de la estrona.



Gráfica 48. Ratio β -estradiol / T en el test de esfuerzo máximo y estable.

Por último, en la gráfica 48 observamos la relación entre la testosterona y el β -estradiol, observando comportamientos similares en ambos tipos de esfuerzo realizado.

En ambas pruebas de esfuerzo se produce un incremento en la ratio, relacionado con un incremento en los niveles de β - estradiol y un descenso en los niveles de testosterona, siendo mayor el incremento en la prueba de esfuerzo incremental máxima, debido a los mayores cambios en ambos parámetros.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 VALORACION DEL RENDIMIENTO FÍSICO

5.1.1 Valoración de la prueba máxima

La diferencia existente entre los dos grupos de esfuerzo queda reflejada en todos los parámetros ergoespirométricos. El grupo de “entrenados” fue capaz de movilizar mayor potencia y tiempo de trabajo, así como alcanzar mayores niveles de VO_2 máximo. Además de las diferencias en cuanto a composición corporal, donde los sujetos entrenados presentaban menores porcentajes de grasa corporal.

El menor cociente respiratorio mostrado por el grupo de “entrenados”, podría indicarnos una mayor utilización del metabolismo lipídico en intensidades submáximas, de forma que existan mayores reservas de glucógeno en los momentos de mayor intensidad de esfuerzo, y puedan obtener así un alto rendimiento. Esta característica supone algunas de las adaptaciones del organismo al entrenamiento de resistencia (Wilmore & Costill, 1998).

5.1.2 Valoración de la prueba en estado estable

Los resultados obtenidos en los parámetros ergoespirométricos en la prueba de esfuerzo submáxima (75-80% de VO_2 máx), muestran claramente las diferencias existentes en cuanto a la eficacia del sistema aeróbico entre uno y otro grupo.

En primer lugar, observamos una inestabilidad en la pendiente de la curva de la frecuencia cardiaca en el grupo de los “no entrenados”, que podría indicarnos una menor capacidad de aguantar una misma intensidad de esfuerzo durante un tiempo prolongado, a diferencia del grupo de “entrenados”, donde la curva es mucho más constante, que podrían ser debido a su mayor eficiencia del sistema aeróbico a intensidades submáximas de esfuerzo.

En algunos casos, los sujetos “no entrenados” acabaron la prueba por encima del umbral anaeróbico. Otra diferencia destacable en ambos grupos, fue la recuperación, ya que podemos observar como el grupo de “entrenados” alcanzó valores prácticamente basales después de 3 minutos de finalizar el esfuerzo, aspecto éste que no ocurrió en el grupo de “no entrenados”, cuya FC permaneció más elevada durante un tiempo mayor, lo cual podría indicarnos una peor capacidad de recuperación de éste último grupo.

Los sujetos “entrenados” presentaban un mayor VO_2 y VCO_2 que el grupo de “no entrenados”, aunque existía una mayor diferencia en el parámetro de consumo de oxígeno que en el de dióxido de carbono, es decir, que el estado metabólico en ambos grupos era más anaeróbico en el grupo de “no entrenados”, a un mismo % de VO_2 máx. Esta diferencia existente muestra las adaptaciones que ocurren con el entrenamiento de resistencia, características del grupo de “entrenados” (Wilmore & Costill, 1998).

Es destacable, como tras 3 minutos de finalizar el esfuerzo, los sujetos “entrenados” presentaban niveles de CO_2 inferiores al grupo de los “no entrenados”, lo que podría indicarnos un esfuerzo soportado más liviano que el grupo de “no entrenados”, que mantenía este parámetro alterado durante más tiempo, indicando una peor recuperación a este tipo de actividad, y un mayor tiempo de eliminación de productos de desecho.

Muy relacionado con estos parámetros, podemos observar el mayor cociente respiratorio (RER) del grupo de “no entrenados”. La menor diferencia entre VO_2 y VCO_2 en este grupo provocó un RER mayor, que podría indicarnos la mayor utilización de hidratos de carbono por parte de estos sujetos. El grupo de “entrenados” estuvo durante toda la prueba con valores de RER por debajo de 1, y por tanto, mayor utilización de los ácidos grasos como combustible para obtener energía, reservando así el glucógeno para intensidad más altas de esfuerzo, siendo ésta una adaptación característica de los sujetos entrenados en resistencia (Galindo, 2000).

En los resultados obtenidos en la prueba submáxima podemos destacar también la frecuencia respiratoria, en la que observamos como al finalizar la prueba, el grupo de “no entrenados” incrementó el número de respiraciones por minuto, que es indicativo de un cambio metabólico, que podría indicar un predominio en los minutos finales del metabolismo glucolítico, con mayor producción de lactato.

Esta respuesta es característica de los sujetos poco entrenados, cuyo sistema aeróbico está poco desarrollado, y rápidamente utilizan el sistema anaeróbico para la obtención de energía de forma más inmediata. Este parámetro, junto con la mayor producción de VCO_2 observada, nos confirma este hecho (Wilmore & Costill, 1998).

5.2 VALORACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Los principales condicionantes que influyen en la producción de radicales libres durante la actividad física son la duración del ejercicio (Mastaloudis *et al.*, 2001) y sobre todo la intensidad del mismo (Lovlin *et al.*, 1987; McBride *et al.*, 1998). Por ello a la hora de valorar el estrés oxidativo y la respuesta antioxidante lo haremos separando las pruebas máximas donde prima la intensidad, frente a las pruebas estables donde prima la duración. Por otro lado, compararemos las diferencias existentes según el grado de entrenamiento de los sujetos, y como éste afecta a la respuesta antioxidante del organismo.

5.2.1 Hemoconcentración y valoración del lactato y hemoglobina

Las modificaciones sufridas por el Hematocrito (Htc) y la Hemoglobina (hb) van a afectar a los demás parámetros obtenidos tras la realización de las diferentes pruebas de esfuerzo, siendo de suma importancia la corrección de los mismos respecto a estas variaciones del Htc y Hb. Algunos estudios resaltan la importancia de la corrección de los datos con los cambios producidos en estos parámetros (Surmen-Gur *et al.*, 1999).

Podemos observar claramente, en ambos grupos, como tras la realización de la pruebas de esfuerzo se produjo un aumento significativo en el Htc, como consecuencia de la pérdida de volumen plasmático con la actividad ($p < 0,001$). En ambos tipos de ejercicio, el grupo de “no entrenados” sufrió un mayor aumento de este parámetro que el grupo de “entrenados”, quizá debido a la menor adaptación a la actividad física, que provoca una mayor producción de calor y pérdida de volumen plasmático (Wilmore & Costill, 1998; Shing *et al.*, 2007).

Al igual que ocurre con el Htc, la Hb sufrió las mismas variaciones tras la realización del esfuerzo, aunque estos cambios eran muy similares en ambos grupos de esfuerzo sin diferencias entre ambos.

En lo referente a la producción de lactato, hubo aumentos estadísticamente significativos tras el ejercicio como era de esperar, siendo mas altos en los sujetos entrenados pues también fueron capaces de desarrollar más potencia. Ambos iniciaron las pruebas máximas con valores muy similares, mientras que tras la realización de las mismas, existía una diferencia significativa en cuanto a la producción de lactato entre grupos ($p < 0,05$). La mayor carga movilizada y la mayor producción de VCO_2 podrían estar relacionadas con estos resultados (Surmen-Gur *et al.*, 1999).

En la prueba de esfuerzo al 80% del VO_2 máx, observamos cambios similares en ambos grupos, no sobrepasando ninguno de ellos los 4 mmol/L establecido como zona de umbral anaeróbico, a partir de la cual, la producción y la acumulación de lactato sería mucho mayor, convirtiéndose el sistema glucolítico como el principal en la obtención de energía para realizar el esfuerzo (López Chicharro, 1991).

5.2.2 Peroxidación lipídica

Hemos podido observar como una prueba de esfuerzo de entre 12-15 minutos de duración produce un aumento en los marcadores de peroxidación lipídica reflejado principalmente por los aumentos estadísticamente significativos del MDA, tanto en el grupo de “entrenados”, como en el de “no entrenados”, tal y como muestran gran cantidad de estudios (Metin *et al.*, 2003a; Metin *et al.*, 2003b; Fatouros *et al.*, 2004).

Probablemente la mayor concentración de MDA alcanzada por los sujetos “entrenados” podía ser debida a una mayor utilización del metabolismo oxidativo, como muestra el mayor VO_2 utilizado por este grupo de sujetos (Kostka *et al.*, 1998), que derivaría en una mayor producción de anión superóxido, y por tanto, un mayor estrés oxidativo (Vani *et al.*, 1990; Shigenaga *et al.*, 1994; Ashton *et al.*, 1999). De igual forma, también podría estar relacionado con una mayor sección transversal de las fibras tipo I en este tipo de sujetos (Morillas-Ruiz *et al.*, 2005).

Si nos centramos en el grupo de entrenados, podemos observar como también se produjo un incremento en el MDA en eritrocitos, estadísticamente significativo. Esto podría ser debido a un incremento en la producción de anión superóxido como consecuencia de un mayor consumo de oxígeno por las células. Cabe destacar que no encontramos diferencias significativas entre el MDA plasmático y el eritrocitario.

La prueba de estado estable, al 80% del VO₂ máx, no provocó incrementos significativos en la producción de MDA, aunque si observamos pequeños aumentos en este parámetro, resultados que son corroborados por otros estudios (Clarkson & Thompson, 2000; Mastaloudis *et al.*, 2001; Morillas-Ruiz *et al.*, 2005). Quizá la actividad del sistema antioxidante de los sujetos fue suficiente como para no producir incrementos significativos en el MDA, por lo que puede ser que a estas intensidades y con esta duración, exista un equilibrio entre la producción de radicales libres y la respuesta antioxidante orgánica. Encontramos los mismos resultados en ambos grupos.

5.2.3 Respuesta antioxidante

La respuesta del organismo ante los procesos de producción de radicales libres ha sido observada mediante las modificaciones del sistema antioxidante no enzimática del organismo ante los diferentes esfuerzos planteados, y en ambos grupos experimentales.

En cuanto a la vitamina C, antioxidante soluble en medio acuoso, existe una respuesta diferente según el tipo de esfuerzo, el grupo experimental, y el análisis en plasma o en eritrocito.

En la prueba incremental máxima encontramos un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la respuesta plasmática de este parámetro, en ambos grupos, tal y como encontramos también en numerosos estudios (Weiss *et al.*, 1983; Santangelo *et al.*, 2003). Este fenómeno, según algunos autores, podría ser debido a un incremento en la actividad de la glándula suprarrenal, en la que existe un reservorio de vitamina C, y que ha sido correlacionada positivamente con valores plasmáticos de cortisol tras el esfuerzo, indicando una estimulación de esta glándula ante las situaciones de estrés (Umegaki *et al.*, 2000).

También hemos observado una variabilidad en cuanto a los valores basales de la vitamina C en las distintas pruebas lo cual puede ser debido al complejo metabolismo de esta sustancia tras el ejercicio y entrenamiento (Shing *et al.*, 2007), que puede disminuirla y por tanto presentarnos valores dispares ante la aleatoriedad de las pruebas efectuadas a los sujetos.

En cuanto a la respuesta eritrocitaria en sujetos entrenados, de esta vitamina, encontramos un descenso estadísticamente significativo tras la prueba de esfuerzo máxima, que algunos autores relacionan con la intensidad del ejercicio (Koz *et al.*, 1992). Este descenso podría ser debido a su utilización para combatir la producción de radicales libres, aunque no hemos encontrado estudios que hagan referencia a este suceso. Otra explicación podría ser la salida de la vitamina C al plasma, pues a nivel celular existe un incremento en la actividad enzimática antioxidante (Mena *et al.*, 1991), que constituye la primera barrera para combatir la producción de ROS.

En la prueba de esfuerzo submáxima, encontramos un comportamiento diferentes de la vitamina C. Mientras que en sujetos “no entrenados” se produjo un pequeño descenso de esta vitamina, en el grupo de “entrenados” los niveles de este parámetro permanecieron prácticamente constantes (Ramel *et al.*, 2004b). Como bien pudimos observar en los datos ergoespirométricos, el esfuerzo realizado por el grupo de “no entrenados” parece que fue mayor que en “entrenados”. Por este motivo, es posible que existiera una mayor producción de anión superóxido (como muestran los incrementos de MDA tras dicha prueba), de forma que se produjera una utilización de la vitamina C para combatir esta producción de radicales libres, tal y como muestran algunos estudios con suplementación de vitamina C, que reduce los parámetros de estrés oxidativo (Goldfarb *et al.*, 2005b). Sin embargo, en el grupo “entrenados”, su adaptación a ese tipo de esfuerzos, no provocó alteraciones en los niveles de vitamina C. En cualquier caso, no encontramos diferencias significativas en ninguno de los 2 grupos.

Igualmente, pudimos observar como a nivel eritrocitario, el grupo de “entrenados” no sufrió prácticamente modificaciones en sus niveles de vitamina C, posiblemente por las características del esfuerzo realizado, y/o por una mayor adaptación en sus enzimas antioxidantes (Mena *et al.*, 1991), existiendo un equilibrio entre la producción y la neutralización de ROS.

En cuanto a las vitaminas liposolubles, destacar los descensos obtenidos en vitamina E plasmática, en la prueba de esfuerzo incremental máxima, siendo este descenso estadísticamente significativo en el grupo de “no entrenados”, coincidiendo estos datos con los encontrados en otros estudios (Ortenblad *et al.*, 1997; Surmen-Gur *et al.*, 1999; Sacke & Blumberg, 2001; Klapcinska *et al.*, 2005).

Los mayores niveles plasmáticos de esta vitamina encontrada en los sujetos “entrenados”, podría implicar adaptaciones al entrenamiento, tal y como muestran determinados estudios, en los que la capacidad antioxidante de sujetos entrenados se encuentra incrementada para frenar el ataque de la mayor producción de radicales libres (Cazzola *et al.*, 2003; Metin *et al.*, 2003a; Metin *et al.*, 2003b). En este sentido, los niveles más elevados de MDA suponen una mayor utilización de esta sustancia por parte del grupo de “entrenados”.

En este grupo, los niveles eritrocitarios también sufrieron un descenso, sin llegar a la significación estadística, y encontramos valores más bajos de este parámetro que en plasma, ya que en el interior celular podrían actuar de forma mucho más notoria las enzimas antioxidantes como la SOD, cuya actividad incrementa como consecuencia de la producción de anión superóxido, y la utilización de esta vitamina sería menor (Marzatico *et al.*, 1997). En cualquier caso, el descenso podría ser atribuible a su actuación cuando otros sistemas antioxidantes no son capaces de neutralizar los radicales libres de oxígeno responsables de la peroxidación lipídica (Bowles *et al.*, 1991).

En la prueba de esfuerzo al 80% encontramos idénticas modificaciones de la vitamina E a nivel plasmático, siendo más acentuado el descenso en sujetos entrenados, que podrían ser atribuidos a su utilización para combatir la peroxidación lipídica (Sacheck *et al.*, 2003). De igual modo encontramos descensos en eritrocitos en sujetos entrenados, sin llegar a la significación estadística.

Por último, la vitamina A sufre diferentes modificaciones según la intensidad y la duración del esfuerzo, así como dependiendo del grado de entrenamiento de los sujetos.

En la prueba de esfuerzo máxima encontramos pequeñas modificaciones en sujetos “no entrenados”, mientras que parece existir un ligero incremento de este parámetro en el grupo de “entrenados”, sin llegar a la significación estadística en ninguno de los casos, tal y como hemos observado en algún estudio, con periodos de esfuerzo de corta duración y gran intensidad (Baker *et al.*, 2004). Igualmente, tal y como ocurría, con la vitamina E, los niveles de este parámetro son mucho más elevados en “entrenados” que en “no entrenados”, con el propósito de combatir la producción de ROS (Cazzola *et al.*, 2003).

En sujetos entrenados, observamos en eritrocitos un comportamiento diferente de esta vitamina. Hemos podido comprobar como se produjo un descenso en este parámetro, tras el esfuerzo máximo, quizá provocado por la salida de esta vitamina hacia el exterior de la célula, tal y como ocurría con la vitamina C, provocando el incremento de esta vitamina en plasma, puesto que a nivel celular, actuarían de forma más importante las enzimas antioxidantes. Quizá el mayor estrés oxidativo provocado en la prueba máxima podría implicar esta tendencia de la vitamina a salir al exterior celular.

Por su parte, el esfuerzo más liviano de la prueba estable, provocó descensos en los niveles de vitamina A, en sujetos “no entrenados”, como en “entrenados” tanto en plasma como en eritrocitos, sin alcanzar la significación estadística, debido probablemente a su utilización en la neutralización de radicales libres de oxígeno, derivados de incremento de VO_2 durante la prueba (Ramel *et al.*, 2004b).

5.3 VALORACIÓN DEL ESTRÉS SOBRE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN ORINA

La respuesta endocrina del organismo ante situaciones de estrés ha sido valorada mediante la realización de dos tipos de actividades diferentes: una en la que prima la intensidad del esfuerzo, con una duración entre 12 y 15 minutos, y otra actividad donde predomina el volumen, 30 minutos de esfuerzo, con una intensidad del 80% del VO_2 máximo. Esta respuesta ha sido analizada en sujetos entrenados, para completar nuestro modelo de estrés, una vez vista la respuesta antioxidante del organismo. En este sentido, vamos a realizar una valoración de los resultados obtenidos atendiendo a parámetros anabólicos y catabólicos, así como la relación entre ambos y la actividad enzimática en el proceso de transformación de unos a otros.

5.3.1 Creatinina

En primer lugar, al igual que hemos llevado a cabo con los parámetros sanguíneos, hemos motrado los resultados realizando la corrección de los mismos respecto al valor de creatinina, y expresado los datos en función de los niveles de ésta, ya que podemos obtener interpretaciones erróneas sin tener en cuenta este factor, debido a que este parámetro nos da información acerca de la dilución de la orina, pues su excreción suele ser constante, si no existen alteraciones renales, tal y como muestran algunos estudios (Bakonska-Pacon, 2006).

En este sentido, hemos podido determinar la importancia de la utilización de este parámetro, pues la tendencia de los datos obtenidos ha cambiado en ocasiones cuando hemos expresado el valor en relación a la creatinina urinaria, lo cual ha cambiado la interpretación de los datos de manera considerable.

5.3.2 Andrógenos

Los niveles obtenidos en andrógenos testiculares y suprarrenales en orina muestran una tendencia al descenso de forma general.

En la prueba de esfuerzo máxima encontramos descensos significativos en androsterona, testosterona y en andrógenos testiculares totales ($p < 0,05$). Es de interés destacar que antes de realizar la corrección de los datos con la creatinina aparecen incluso significaciones estadísticas en algunos parámetros, que luego desaparecen al tener en cuenta la dilución urinaria. Los datos obtenidos concuerdan con otros estudios, en los que exponen que esta disminución podría ser debida a una menor tasa de aclaramiento de estas hormonas por parte del hígado debido a la menor perfusión que provoca el ejercicio físico intenso (Galbo *et al.*, 1977; Pucsok *et al.*, 2005; Timon Andrada *et al.*, 2007). Esta hipótesis podría ser corroborada por los datos plasmáticos elevados obtenidos en otros estudios tras la realización de esfuerzos de alta intensidad, que indicarían que no existe una disminución en la producción de andrógenos testiculares (Ponjee *et al.*, 1994; Suay *et al.*, 1999). Incluso en periodos iniciales de entrenamiento en los que observan elevaciones durante las primeras semanas (Mero *et al.*, 1997; McBride *et al.*, 1998)

Por otro lado encontramos autores que establecen que esta disminución podría ser debida a una disfunción en el eje hipotalámico-pituitario que provocaría una menor producción de testosterona libre y total y por tanto un menor excreción de la misma en orina y de sus metabolitos cuando la intensidad del ejercicio es muy alta, aunque estos estudios fueron realizados en periodos largos de entrenamiento y con actividades de gran duración (Kujala *et al.*, 1990; Flynn *et al.*, 1997).

En cualquier caso, la tendencia al descenso, al no ser estadísticamente significativa, hay que tomarla con precaución, siendo necesaria la obtención de los niveles androgénicos en orina y en sangre a la vez, para determinar de forma concluyente la cinética de estas hormonas.

En la prueba de esfuerzo submáxima de 30 minutos de duración al 80% del VO_2 máximo, donde el metabolismo predominante es el aeróbico, obtenemos datos similares, aunque con menores modificaciones de las hormonas anabólicas, sobre todo en etiocolanona, testosterona y DHT, lo cual podría indicar un menor grado de estrés de este tipo de esfuerzos, y tal y como afirman algunos autores, la respuesta hormonal solo se produciría si las cargas utilizadas son lo suficientemente elevadas (Hakkinen & Pakarinen, 1993; Schwab *et al.*, 1993). En este sentido, la menor intensidad del esfuerzo implicaría una menor redistribución de flujo, que podría favorecer un mayor aclaramiento hepático de estas hormonas androgénicas, por lo que el descenso observado en las mismas también sería menor.

En cualquier caso, encontramos que los valores iniciales en la prueba de esfuerzo submáxima son mayores que en la prueba máxima. Este factor podría ser debido al tiempo transcurrido entre ambos esfuerzos (48 horas), que provocaría que los sujetos entrenados presentaran un estado anabólico, tal y como nos muestran otros estudios (Timon Andrada *et al.*, 2007). Por su parte, los niveles basales de corticosteroides en el esfuerzo estable no presentan diferencias con respecto a la prueba máxima, lo cual indica un bajo estado catabólico de los sujetos. Por otro lado, los niveles de andógenos suprarrenales, también muy similares al inicio de ambas pruebas, indicarían una diferente respuesta de los ejes hipotalámico-testicular, y el eje hipotalámico-suprarrenal, detectando a nivel testicular, una respuesta más tardía y con necesidad de más tiempo para volver a los niveles basales.

Atendiendo a los andrógenos suprarrenales, encontramos diferentes resultados que en el caso de los testiculares según el tipo de esfuerzo. Tras la realización de ambos ejercicios aparecen descensos en estos andrógenos, de modo que parece ser que en la prueba de esfuerzo submáxima los descensos son más acentuados, llegando incluso a ser estadísticamente significativos en el caso de la androstenodiona y andrógenos suprarrenales totales ($p < 0,05$). Cabe destacar que antes de realizar la corrección de los datos con la creatinina, algunos parámetros tenían tendencia al incremento tras el esfuerzo, pero una vez realizada dicha corrección la tendencia de todos ellos es al descenso.

En definitiva, podemos establecer mayores descensos de andrógenos testiculares en la prueba de esfuerzo hasta el agotamiento, mientras que en la prueba de esfuerzo submáxima, los descensos más importantes aparecen en los andrógenos suprarrenales, que podría indicarnos una mayor sensibilidad al volumen en el caso de la corteza supra-

renal, y a la intensidad en el caso del eje hipofisario-testicular, aunque no hemos encontrado estudios que indiquen este hecho, por lo que seguiremos tratando de indagar en el mismo.

5.3.3 Corticosteroides

En cuanto a los niveles de corticosteroides, es decir, cortisona y cortisol, y sus metabolitos urinarios, THC y THCoI, hemos podido observar en los resultados como la suma de todos ellos tiende generalmente al descenso en ambos tipos de esfuerzos, siendo más acentuado el descenso en la excreción urinaria en el caso del esfuerzo submáximo.

En ningún caso hemos encontrado modificaciones estadísticamente significativas, aunque destacamos que en la prueba de esfuerzo máxima, los niveles de THC incrementan, mientras que en el ejercicio submáximo, los niveles de cortisol permanecen prácticamente invariables, y los demás corticosteroides descienden.

En esfuerzos de alta intensidad, encontramos descensos en los niveles urinarios de corticosteroides, salvo el THC, que presenta un pequeño incremento, no significativo, al final del esfuerzo. Este descenso generalizado de corticosteroides podría estar relacionado con una menor tasa de aclaramiento hepático, y una mayor retención de hormonas catabólicas por parte del organismo. Cabe destacar que, en nuestro estudio, aunque la intensidad del esfuerzo es elevada (hasta el agotamiento voluntario), es posible que la duración sea demasiado corta para producir tendencias claramente definidas de los niveles urinarios de corticosteroides, por lo que sería necesario seguir profundizando en la relación intensidad y volumen, para determinar en que medida podría afectar cada factor al perfil esteroideo.

Por otro lado, en actividades de larga duración observamos que existen investigaciones que encuentran niveles plasmáticos de cortisol elevados (Suay *et al.*, 1999; Ronzen *et al.*, 2001), que relacionan con un volumen elevado de esfuerzo, más que con la intensidad, por lo que en nuestro caso, aunque se produce una pequeña elevación, el volumen y la intensidad total del esfuerzo no es demasiado exigente para sujetos entrenados, como para producir cambios significativos. En cualquier caso, los niveles urinarios de corticosteroides totales en la prueba de esfuerzo submáxima descienden post ejercicio, lo que podría también estar relacionado con una menor tasa de aclaramiento hepático, y una mayor retención de hormonas catabólicas por parte del organismo. Solo en el caso del cortisol no encontramos prácticamente modificaciones en su excreción urinaria,

tal y como muestran algunos estudios, incluso en ciclistas, en lo que al referenciar los niveles de cortisol y cortisona con los niveles de creatinina no encuentran cambios significativos en estos parámetros después de la actividad (Gatti *et al.*, 2005).

5.3.4 Relación Anabolismo/catabolismo, actividad 5 α -reductasa y aromatización

Por último, vamos a analizar el estado que provoca cada tipo de actividad sobre el organismo, y determinar cuál de ellas produce un mayor catabolismo al organismo, teniendo en cuenta que una de ellas es predominante en volumen y la otra en intensidad. También presentamos la actividad de la 5 α - reductasa así como la relacionada con la conversión de andrógenos a estrógenos.

Para ello, presentamos las siguientes relaciones:

- Relaciones andrógenos testiculares totales / corticosteroides totales y andrógenos suprarrenales totales / corticosteroides totales, para determinar el grado de estrés producido por los diferentes tipos de esfuerzo, y establecer el marcador más adecuado que indique de una forma correcta el grado de anabolismo o catabolismo que genera el esfuerzo.
- Relaciones T/THC, T/THCoI, DHEA/THC y DHEA/THCoI, para determinar grado de anabolismo / catabolismo, con diferentes orígenes androgénicos.
- Actividad de la enzima 5 α – reductasa: mediante las relaciones entre los metabolitos de la testosterona, como son la eticolanolona / androsterona, así como la relación DHT / T, reacciones catalizadas por dicha enzima.
- Aromatización, mediante las relaciones estrona / androstenodiona, y β -estradiol / T, lugares donde interviene dicha enzima.

Los resultados que relacionan las hormonas anabólicas y catabólicas muestran todos una misma tendencia, aunque encontramos diferencias según el origen de los andrógenos, sobre todo en la prueba de esfuerzo submáxima. Tanto las relaciones establecidas con los andrógenos testiculares totales y andrógenos suprarrenales totales con los corticosteroides totales indican un grado de estrés diferente según el esfuerzo realizado. En este sentido, el esfuerzo incremental máximo hasta el agotamiento provoca un descenso en esta relación, que nos podría indicar que el organismo se encuentra en un mayor estado catabólico. Como sabemos, en esfuerzos de alta intensidad, existe una

redistribución del flujo sanguíneo hacia aquellas zonas que requieren de una mayor vascularización para soportar los requerimientos de la actividad realizada. Es por ello, que podría suceder que se produjera una disminución en el flujo hepático y renal, y por consiguiente, un descenso en la conjugación hepática de esteroides, que nos llevaría a una menor eliminación renal de los mismos.

Creemos que podría ocurrir en primer lugar, como respuesta al estrés, una estimulación de la médula suprarrenal, con incrementos en hormonas tales como la adrenalina y la noradrenalina, y en nuestro estudio observado con incrementos producidos en vitamina C en el esfuerzo máximo, efecto éste relacionado en otros estudios (Ramel *et al.*, 2004a). Por contra, la corteza suprarrenal sufriría en mayor medida la falta de flujo, lo cual produciría una menor eliminación de esteroides por parte del riñón.

Sin embargo, en el esfuerzo submáximo, de carácter predominantemente aeróbico, observamos como esta relación se invierte, produciendo una elevación en la relación anabolismo/catabolismo, tal y como encontramos en algunos estudios (Tremblay *et al.*, 2005). En este sentido, al ser una actividad de menor intensidad, el correcto tránsito de flujo permitiría una mayor conjugación hepática de esteroides y por tanto una mayor eliminación de los mismos, ya que como hemos observado en otros estudios, se produce un incremento en los niveles plasmáticos de testosterona (Ponjee *et al.*, 1994; Suay *et al.*, 1999), de forma que se incrementaría su eliminación por vía urinaria también.

Igualmente, el mayor descenso en los niveles urinarios de corticosteroides totales favorece el incremento de la relación de ambos parámetros, lo cual no llevaría a pensar que los esfuerzos con predominio de volumen, producirían un menor estrés que los esfuerzos de alta intensidad.

Debemos destacar los resultados obtenidos en la relación DHEA/THCoI, ya que a nivel estadístico es la única relación en la que encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$), y a la vez, un descenso al final del esfuerzo submáximo. Este descenso es producido sobre todo, por la disminución en los niveles de DHEA urinarios tras la actividad, como hemos comentado anteriormente, mayor que en el caso del THCoI, esto indicaría como ya comentamos al valorar los esteroides anabólicos suprarrenales, que este tipo de actividad produce una mayor actividad en la zona fascicular de la corteza suprarrenal y una menor respuesta en la zona reticular lo que lleva a una mayor producción de esteroides catabólicos que de anabólicos-androgénicos.

Por otro lado, creemos importante el análisis de la actividad de la enzima 5 α -reductasa, como enzima directamente relacionada con la transformación de la testosterona en DHT y androsterona en eticolanolona. Cabe destacar, que en ambos esfuerzos esta relación se ve incrementada, aunque de manera no significativa, con el objetivo de aumentar la DHT, que es la forma activa de la testosterona. También podría ser consecuencia de la disminución en el aclaramiento hepático de la testosterona y su incremento en plasma, por lo que la manera que tendría el organismo de metabolizarla sería su transformación a DHT, favoreciendo de esta forma un ambiente más anabólico para la regeneración tisular y hacer frente al estrés producido por el organismo.

Por último, hemos analizado la actividad de la aromatasa, que transforma los andrógenos a estrógenos. Ésta es otra importante vía de metabolización de la testosterona a estradiol o la androstenodiona a estrona. En este sentido, existen diferencias entre los distintos esfuerzos realizados. En la prueba de esfuerzo máxima, existe un incremento en la relación β -estradiol / testosterona, que indicaría una mayor producción de β -estradiol a partir de la testosterona. Sin embargo, en la prueba de esfuerzo submáxima, la relación disminuye, lo que indicaría una menor transformación de testosterona hacia estrógeno. Esta relación estaría directamente relacionada con la caída en orina que sufre la testosterona en ambas pruebas de esfuerzo, que nos podría hacer descartar una menor producción de esta hormona, y pensar que se produciría un incremento en su transformación a otras sustancias, como estrógenos o DHT.

Por otro lado, encontramos descensos en ambas pruebas en la relación existente entre la androstenodiona y la estrona, llegando a ser estadísticamente significativa en la prueba de esfuerzo submáxima ($p < 0,05$). Esta caída implicaría una menor transformación de andrógenos a estrógenos, con el fin de favorecer un estado anabólico y responder frente al estrés generado por el esfuerzo.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

6 RESUMEN Y CONCLUSIONES

Tradicionalmente, la práctica deportiva y la capacidad para consumir grandes volúmenes de oxígeno han estado asociadas directamente con un efecto beneficioso para el organismo. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que el ejercicio físico es fuente natural de radicales libres de oxígeno que pueden provocar daño celular al organismo y todo lo que ello conlleva. Para hacer frente a esta producción de radicales libres, el organismo tiene varios mecanismos de defensa, tanto enzimáticos como no enzimáticos.

Por otra parte, el estrés producido por el ejercicio físico, sea cual sea su intensidad va a provocar una serie de respuestas a nivel fisiológico y orgánico a través de mecanismos neuro-endocrino-metabólicos, con el fin de mantener la homeostasis y el equilibrio en el organismo.

Por ello hemos pretendido establecer un modelo de estrés que nos permita, por un lado, determinar el grado de daño celular que producen diferentes tipos de actividad física, y por otro, el estrés hormonal que provocan dichos esfuerzos.

Para ellos hemos llevado a cabo en laboratorio dos esfuerzos de diferentes intensidad y volumen, una ergoespirometría incremental máxima hasta el agotamiento, y una prueba de esfuerzo submáxima, al 80% del VO_2 máximo, durante 30 minutos, tanto en sujetos sedentarios como en deportistas. Antes y después de cada prueba se extrajo una muestra de sangre y de orina, para su posterior análisis.

Los datos extraídos en plasma y eritrocitos estaban relacionados con el estrés oxidativo, mediante la medición del MDA; mientras que la respuesta antioxidante no enzimática del organismo fue evaluada mediante las vitaminas A, C y E. El procesamiento de los datos fue llevado a cabo mediante HPLC.

Por otro lado, para la valoración del estrés hormonal producido por los diferentes tipos de esfuerzos, analizamos mediante cromatografía de gases/ espectrometría de masas los siguientes parámetros: andrógenos testiculares y suprarrenales, corticosteroides, estrógenos, y relaciones entre ellos, para determinar el grado de estrés producido y la actividad enzimática.

Los resultados obtenidos sugieren que actividades de alta intensidad producen un desequilibrio entre la respuesta antioxidante del organismo y la generación de radicales libres de oxígeno, así como un incremento en los niveles de hormonas catabólicas (corticosteroides), provocando de esta manera mayor un estrés oxidativo y estado catabólico que actividades de menor intensidad y mayor duración.

Por su parte, actividades de carácter predominantemente aeróbico, con intensidades en torno al 80% del VO_2 máximo, y duraciones de 30 minutos, a pesar de que incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno, los sistemas antioxidantes son capaces de neutralizar estas ROS y mantener un equilibrio entre ambos sistemas, de forma que el daño celular se reduzca. A nivel hormonal, existe un mayor equilibrio entre hormonas anabólicas y catabólicas, que implican un menor estrés al organismo.

Teniendo en cuenta los objetivos planteados en la presente tesis, y los resultados obtenidos, podemos concluir lo siguiente:

1.- A nivel erogspirométrico, la eficiencia energética del grupo de “entrenados” es mucho mayor en la prueba de esfuerzo submáxima que en el grupo de “no entrenados”.

2.- Esfuerzos de 15 minutos de duración y de alta intensidad, provocan un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante no enzimática del organismo, tanto en sujetos “no entrenados” como en “entrenados”.

3.- Actividades de carácter aeróbico (al 80% del VO_2 máximo) de 30 minutos de duración, a pesar de producir especies reactivas de oxígeno, no provocan desequilibrios entre la respuesta antioxidante y el posible daño celular inducido por el ejercicio.

4.- La capacidad antioxidante se encuentra más desarrollada en el grupo de “entrenados”, como consecuencia de la adaptación provocada por una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, resultado de un mayor VO_2 máximo.

5.- Los niveles de antioxidantes no enzimáticos son mayores en plasma que en eritrocitos, salvo en el caso de la vitamina C, pues en eritrocitos actúan de forma más dire-

cta los antioxidantes enzimáticos, constituyendo los “no enzimáticos” una segunda barrera de protección frente a los radicales libres de oxígeno.

6.-Las actividades de mayor intensidad, aunque sean de corta duración, provocan un mayor estrés en el organismo, y activan de forma importante la glándula suprarrenal, a nivel de la médula y posteriormente de la corteza suprarrenal.

7.- La prueba de esfuerzo incremental máxima, hasta el agotamiento provoca un incremento en la excreción de hormonas catabólicas y un descenso en la de hormonas anabólicas, mayor que el producido por actividades de carácter submáximo de mayor volumen y con predominio del metabolismo aeróbico, sin producción de altos niveles de lactato.

8.- La utilización de las ratios androgénos suprarrenales /corticosteroides, como marcadores de estrés serían las más recomendables, debido a que ambos tienen el mismo origen de síntesis, y sus relaciones parecen más estables que las ratios andrógenos testiculares /corticosteroides.

9.- La actividad de la enzima aromatasa disminuye con la actividad física.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

7 SUMMARY AND CONCLUSIONS

Physical exercise has been traditionally associated with positive effects for human health. However some research shows how physical activity and oxygen consumption are a natural source of free radicals which may provokes cellular damage. In order to protect cells against these free radicals, human body counts with antioxidant systems, enzymatic and non-enzymatic.

Other way, physical stress induced by physical activity, apart from its intensity, produces physiological responses through of neurologic, endocrine and metabolic pathways, with the purpose of keeping unaltered homeostasis.

Therefore we have developed a stress model which could determine cellular damage and hormonal changes due to different kinds of physical activity.

Two different intensity and volume effort test were performed in laboratory: a) Incremental maximum exercise, b) Steady State Test at 80%VO₂ max limited up 30 minutes. Before and after each trial blood and urine samples were collected for its shortly analysis.

Plasma and erythrocyte data were in relation with oxidative stress, evaluating MDA as oxidative marker and vitamins A, C and E as antioxidant response and systems. All these substances were analyzed using HPLC techniques.

Hormonal study was measured by chromatographic techniques GS/MS, analyzing testicular and suprarenal androgens, as well as corticosteroids and androgens.

Results obtained suggest how high intensity activities generate an imbalance between free radical production and human body antioxidant response, in addition to an increase in catabolic hormones (corticosteroids). Steady state aerobic activities, in spite of increasing reactive oxygen species (ROS), they provoke an antioxidant response which is able to offset ROS without any oxidative cellular damage. In relation to hormonal levels, there is a balance between catabolic/anabolic hormones, so physical stress is lower.

According to proposed objectives and mainly results, we can conclude that:

1.- In relation with submaximal ergometric test, "trained subjects" reach a higher energetic efficiency than "non trained subjects".

2.- Antioxidant response in high intensity efforts (15 minutes) generates an imbalance between reactive oxygen species and antioxidant systems both in trained and non trained subjects.

3.- Steady state aerobic activities at 80% VO_2 max and limited up to 30 minutes do not generate oxidative damage due to an appropriate antioxidant response.

4.- Antioxidant capacity is better in trained subjects than in non trained ones as consequence of physiological adaptation to higher oxygen consumption.

5.- Non enzymatic plasma antioxidants are higher than erythrocyte antioxidants, with the exception of vitamin C. Enzymatic antioxidant act in a first way into erythrocyte.

6.- High intensity activities, despite their short duration, generate higher stress in organismo and activate suprarenal glandule: firstly medulla and afterwards suprarenal cortex.

7.- Maximal effort trials provoke an increase in catabolic hormones as well as a decrease in urinary anabolic hormone excretion, bigger that induced by sub-maximal aerobic activities with higher volumes and without high lactate levels.

8.- To determine anabolic/catabolic status induced by physical activity, we suggest to analyze suprarenal androgens / corticosteroids ratios as stress markers, due to both of them have the same origin and therefore their relation may be more stable than testicular androgen / corticosteroids ratios.

9.- Aromatasa activity decreases with physical activity.

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Adlercreutz H, Harkonen M, Kuoppasalmi K, Naveri H, Huhtaniemi I, Tikkanen H, Remes K, Dessypris A & Karvonen J. (1986). Effect of training on plasma anabolic and catabolic steroid hormones and their response during physical exercise. *Int J Sports Med* 7 Suppl 1, 27-28.
2. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A & Pons A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84, 1-7.
3. Alessio HM. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25, 218-224.
4. Alessio HM, Goldfarb AH & Cutler RG. (1988). MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol* 255, C874-877.
5. Aruoma OI. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 32, 671-683.
6. Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ & Gutteridge JM. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* 258, 617-620.
7. Ashton T, Young IS, Peters JR, Jones E, Jackson SK, Davies B & Rowlands CC. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol* 87, 2032-2036.
8. Baker JS, Bailey DM, Hullin D, Young I & Davies B. (2004). Metabolic implications of resistive force selection for oxidative stress and markers of muscle damage during 30 s of high-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol* 92, 321-327.
9. Bakonska-Pacon E. (2006). Creatinine clearance and 24-hour creatinine excretion profile in the urine of people after physical exercises. *Biology of Sport* 23 (2), 157-170.

10. Ballarin E, Guglielmini C, Martinelli S, Casoni I, Borsetto C, Ziglio PG & Conconi F. (1986). Unmodified performance in runners following anabolic steroid administration. *Int J Sports Med* 7, 302-306.
11. Behrend L, Henderson G & Zwacka RM. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 31, 1441-1444.
12. Bishop P & Martino M. (1993). Blood lactate measurement in recovery as an adjunct to training. Practical considerations. *Sports Med* 16, 5-13.
13. Bloomer RJ, Falvo MJ, Fry AC, Schilling BK, Smith WA & Moore CA. (2006). Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Med Sci Sports Exerc* 38, 1436-1442.
14. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ & Consitt LA. (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res* 19, 276-285.
15. Bosco C, Colli R, Bonomi R, von Duvillard SP & Viru A. (2000a). Monitoring strength training: neuromuscular and hormonal profile. *Med Sci Sports Exerc* 32, 202-208.
16. Bosco C, Iacovelli M, Tsarpela O, Cardinale M, Bonifazi M, Tihanyi J, Viru M, De Lorenzo A & Viru A. (2000b). Hormonal responses to whole-body vibration in men. *Eur J Appl Physiol* 81, 449-454.
17. Bosco C, Tihanyi J, Rivalta L, Parlato G, Tranquilli C, Pulvirenti G, Foti C, Viru M & Viru A. (1996). Hormonal responses in strenuous jumping effort. *Jpn J Physiol* 46, 93-98.
18. Boudou P, Fiet J, Laureaux C, Patricot MC, Guezennec CY, Foglietti MJ, Villette JM, Friemel F & Haag JC. (1987). [Changes in several plasma and urinary components in marathon runners]. *Ann Biol Clin (Paris)* 45, 37-45.

19. Bowles DK, Torgan CE, Ebner S, Kehrer JP, Ivy JL & Starnes JW. (1991). Effects of acute, submaximal exercise on skeletal muscle vitamin E. *Free Radic Res Commun* 14, 139-143.
20. Breen AP & Murphy JA. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18, 1033-1077.
21. Brown GA, Vukovich MD, Reifenrath TA, Uhl NL, Parsons KA, Sharp RL & King DS. (2000). Effects of anabolic precursors on serum testosterone concentrations and adaptations to resistance training in young men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 10, 340-359.
22. Brown GC. (1995). Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 369, 136-139.
23. Bryant RJ, Ryder J, Martino P, Kim J & Craig BW. (2003). Effects of vitamin E and C supplementation either alone or in combination on exercise-induced lipid peroxidation in trained cyclists. *J Strength Cond Res* 17, 792-800.
24. Burton GW, Joyce A & Ingold KU. (1982). First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 2, 327.
25. Burton GW, Joyce A & Ingold KU. (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221, 281-290.
26. Burton GW & Traber MG. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10, 357-382.
27. Busso T, Hakkinen K, Pakarinen A, Kauhanen H, Komi PV & Lacour JR. (1992). Hormonal adaptations and modelled responses in elite weightlifters during 6 weeks of training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64, 381-386.
28. Carr AC & Frei B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr* 69, 1086-1107.

29. Cashmore GC, Davies CT & Few JD. (1977). Relationship between increases in plasma cortisol concentration and rate of cortisol secretion during exercise in man. *J Endocrinol* 72, 109-110.
30. Cavas L & Tarhan L. (2004). Effects of vitamin-mineral supplementation on cardiac marker and radical scavenging enzymes, and MDA levels in young swimmers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14, 133-146.
31. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G & Cestaro B. (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest* 33, 924-930.
32. Clarkson PM & Thompson HS. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 72, 637S-646S.
33. Close GL, Ashton T, Cable T, Doran D & MacLaren DP. (2004). Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur J Appl Physiol* 91, 615-621.
34. Craig BW, Brown R & Everhart J. (1989). Effects of progressive resistance training on growth hormone and testosterone levels in young and elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 49, 159-169.
35. Cheeseman KH & Slater TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49, 481-493.
36. Child RB, Wilkinson DM & Fallowfield JL. (2000). Effects of a training taper on tissue damage indices, serum antioxidant capacity and half-marathon running performance. *Int J Sports Med* 21, 325-331.
37. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL & Donnelly AE. (1998). Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 30, 1603-1607.
38. Dean RT, Fu S, Stocker R & Davies MJ. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 (Pt 1), 1-18.

39. Dekkers JC, van Doornen LJ & Kemper HC. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 21, 213-238.
40. Dixon CB, Robertson RJ, Goss FL, Timmer JM, Nagle EF & Evans RW. (2006). The effect of acute resistance exercise on serum malondialdehyde in resistance-trained and untrained collegiate men. *J Strength Cond Res* 20, 693-698.
41. Dressendorfer RH & Wade CE. (1991). Effects of a 15-d race on plasma steroid levels and leg muscle fitness in runners. *Med Sci Sports Exerc* 23, 954-958.
42. Duclos M, Corcuff JB, Rashedi M, Fougere V & Manier G. (1996). Does functional alteration of the gonadotropic axis occur in endurance trained athletes during and after exercise? A preliminary study. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 73, 427-433.
43. Durocher LL, Hinchcliff KW, Williamson KK, McKenzie EC, Holbrook TC, Willard M, Royer CM & Davis MS. (2007). Effect of strenuous exercise on urine concentrations of homovanillic acid, cortisol, and vanillylmandelic acid in sled dogs. *Am J Vet Res* 68, 107-111.
44. Duthie G & Crozier A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3, 447-451.
45. Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ & Morrice PC. (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 282, 78-83.
46. Eklow L, Moldeus P & Orrenius S. (1984). Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism. A study using isolated hepatocytes and the glutathione reductase inhibitor 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Eur J Biochem* 138, 459-463.
47. Elokda AS, Shields RK & Nielsen DH. (2005). Effects of a maximal graded exercise test on glutathione as a marker of acute oxidative stress. *J Cardiopulm Rehabil* 25, 215-219.

48. Esterbauer H, Lang J, Zadavec S & Slater TF. (1984). Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 105, 319-328.
49. Evans P & Halliwell B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85 Suppl 2, S67-74.
50. Farrell PA, Kjaer M, Bach FW & Galbo H. (1987). Beta-endorphin and adrenocorticotropin response to supramaximal treadmill exercise in trained and untrained males. *Acta Physiol Scand* 130, 619-625.
51. Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V, Pouliopoulou S, Fotinakis P, Taxildaris K & Deliconstantinos G. (2004). Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc* 36, 2065-2072.
52. Few JD. (1974). Effect of exercise on the secretion and metabolism of cortisol in man. *J Endocrinol* 62, 341-353.
53. Filaire E, Bernain X, Sagnol M & Lac G. (2001). Preliminary results on mood state, salivary testosterone:cortisol ratio and team performance in a professional soccer team. *Eur J Appl Physiol* 86, 179-184.
54. Filaire E, Duche P & Lac G. (1998). Effects of training for two ball games on the saliva response of adrenocortical hormones to exercise in elite sportswomen. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 77, 452-456.
55. Filaire E & Lac G. (2000). Dehydroepiandrosterone (DHEA) rather than testosterone shows saliva androgen responses to exercise in elite female handball players. *Int J Sports Med* 21, 17-20.
56. Finkel T & Holbrook NJ. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
57. Fischer HG, Hartmann U, Becker R, Kommans B, Mader A & Hollmann W. (1992). The excretion of 17-ketosteroids and 17-hydroxycorticosteroids in night urine of elite rowers during altitude training. *Int J Sports Med* 13, 15-20.

58. Flynn MG, Pizza FX & Brolinson PG. (1997). Hormonal responses to excessive training: influence of cross training. *Int J Sports Med* 18, 191-196.
59. Frei B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97, 5S-13S; discussion 22S-28S.
60. Fry AC, Kraemer WJ & Ramsey LT. (1998). Pituitary-adrenal-gonadal responses to high-intensity resistance exercise overtraining. *J Appl Physiol* 85, 2352-2359.
61. Galan Martin AM, Marino JI, Garcia de Tiedra MP, Marabe JJ, Caballero Loscos MJ & Marino MM. (2001). Determination of nandrolone and metabolites in urine samples from sedentary persons and sportsmen. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 761, 229-236.
62. Galbo H, Hummer L, Peterson IB, Christensen NJ & Bie N. (1977). Thyroid and testicular hormone responses to graded and prolonged exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 36, 101-106.
63. Galindo JD. (2000). Metabolismo de lípidos. Lipoproteínas. In *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud*, 2 edn, pp. 167-188. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
64. Gatti R, Cappellin E, Zecchin B, Antonelli G, Spinella P, Mantero F & De Palo EF. (2005). Urinary high performance reverse phase chromatography cortisol and cortisone analyses before and at the end of a race in elite cyclists. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 824, 51-56.
65. Gleeson M, Robertson JD & Maughan RJ. (1987). Influence of exercise on ascorbic acid status in man. *Clin Sci (Lond)* 73, 501-505.
66. Goldfarb AH, Bloomer RJ & McKenzie MJ. (2005a). Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 37, 234-239.

67. Goldfarb AH, Patrick SW, Bryer S & You T. (2005b). Vitamin C supplementation affects oxidative-stress blood markers in response to a 30-minute run at 75% VO₂max. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 15, 279-290.
68. Goodman C, Henry G, Dawson B, Gillam I, Beilby J, Ching S, Fabian V, Dasig D, Kakulas B & Morling P. (1997). Biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after a twenty-one kilometre run. *Aust J Sci Med Sport* 29, 95-98.
69. Groussard C, Machefer G, Rannou F, Faure H, Zouhal H, Sergent O, Chevanne M, Cillard J & Gratas-Delamarche A. (2003a). Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate test. *Can J Appl Physiol* 28, 79-92.
70. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J & Gratas-Delamarche A. (2003b). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 89, 14-20.
71. Hackney AC, Ness RJ & Schrieber A. (1989). Effects of endurance exercise on nocturnal hormone concentrations in males. *Chronobiol Int* 6, 341-346.
72. Hackney AC, Sinning WE & Bruot BC. (1990). Hypothalamic-pituitary-testicular axis function in endurance-trained males. *Int J Sports Med* 11, 298-303.
73. Hackney AC & Viru A. (1999). Twenty-four-hour cortisol response to multiple daily exercise sessions of moderate and high intensity. *Clin Physiol* 19, 178-182.
74. Hakkinen K. (1989). Neuromuscular and hormonal adaptations during strength and power training. A review. *J Sports Med Phys Fitness* 29, 9-26.
75. Hakkinen K & Pakarinen A. (1991). Serum hormones in male strength athletes during intensive short term strength training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 63, 194-199.
76. Hakkinen K & Pakarinen A. (1993). Acute hormonal responses to two different fatiguing heavy-resistance protocols in male athletes. *J Appl Physiol* 74, 882-887.

77. Hakkinen K, Pakarinen A, Alen M, Kauhanen H & Komi PV. (1988). Daily hormonal and neuromuscular responses to intensive strength training in 1 week. *Int J Sports Med* 9, 422-428.
78. Hakkinen K, Pakarinen A, Kraemer WJ, Newton RU & Alen M. (2000). Basal concentrations and acute responses of serum hormones and strength development during heavy resistance training in middle-aged and elderly men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55, B95-105.
79. Halliwell B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 70, 737-757.
80. Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724.
81. Halliwell B & Aruoma OI. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281, 9-19.
82. Halliwell B & Cross CE. (1991). Reactive oxygen species, antioxidants, and acquired immunodeficiency syndrome. Sense or speculation? *Arch Intern Med* 151, 29-31.
83. Halliwell B & Grootveld M. (1987). The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett* 213, 9-14.
84. Halliwell B & Gutteridge JM. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1-85.
85. Halliwell B & Gutteridge JMC. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
86. Hedelin R, Kentta G, Wiklund U, Bjerle P & Henriksson-Larsen K. (2000). Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. *Med Sci Sports Exerc* 32, 1480-1484.

87. Hernandez R, Mahedero G, Caballero MJ, Rodriguez J, Manjon I, Rodriguez I & Maynar M. (1999). Effects of physical exercise in pre-and postmenopausal women on lipid peroxidation and antioxidant systems. *Endocr Res* 25, 153-161.
88. Hillstrom RJ, Yacopin-Ammons AK & Lynch SM. (2003). Vitamin C inhibits lipid oxidation in human HDL. *J Nutr* 133, 3047-3051.
89. Holloszy JO. (1993). Exercise increases average longevity of female rats despite increased food intake and no growth retardation. *J Gerontol* 48, B97-100.
90. Izquierdo M, Hakkinen K, Ibanez J, Garrues M, Anton A, Zuniga A, Larrion JL & Gorostiaga EM. (2001). Effects of strength training on muscle power and serum hormones in middle-aged and older men. *J Appl Physiol* 90, 1497-1507.
91. Jahreis G, Kauf E, Frohner G & Schmidt HE. (1991). Influence of intensive exercise on insulin-like growth factor I, thyroid and steroid hormones in female gymnasts. *Growth Regul* 1, 95-99.
92. Jenkins RR. (1993). Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr* 3, 356-375.
93. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R & Packer L. (1992). Dihydrolipoic acid--a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 44, 1637-1649.
94. Kaikkonen J, Kosonen L, Nyysönen K, Porkkala-Sarataho E, Salonen R, Korpela H & Salonen JT. (1998). Effect of combined coenzyme Q10 and d-alpha-tocopheryl acetate supplementation on exercise-induced lipid peroxidation and muscular damage: a placebo-controlled double-blind study in marathon runners. *Free Radic Res* 29, 85-92.
95. Kanter MM. (1994). Free radicals, exercise, and antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr* 4, 205-220.

96. Kanter MM, Lesmes GR, Kaminsky LA, La Ham-Saeger J & Nequin ND. (1988). Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57, 60-63.
97. Kanter MM, Nolte LA & Holloszy JO. (1993). Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol* 74, 965-969.
98. Keizer H, Janssen GM, Menheere P & Kranenburg G. (1989). Changes in basal plasma testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone sulfate in previously untrained males and females preparing for a marathon. *Int J Sports Med* 10 Suppl 3, S139-145.
99. Ketterer B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 16, 957-973.
100. Kimura N, Ito T & Nishikawa S. (1989). [A study on the effects of the physical load of instructors during ice skating camp]. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 44, 839-846.
101. Kinnunen S, Hyyppa S, Lehmuskero A, Oksala N, Maenpaa P, Hanninen O & Atalay M. (2005). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. *Eur J Appl Physiol* 95, 550-556.
102. Klapcinska B, Kempa K, Sobczak A, Sadowska-Krepa E, Jagsz S & Szoltysek I. (2005). Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL (oLAB) and blood antioxidant status in professional soccer players. *Int J Sports Med* 26, 71-78.
103. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH & Kaplowitz N. (1992). Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 15, 507-514.
104. Kostka T, Draai J, Berthouze SE, Lacour JR & Bonnefoy M. (1998). Physical activity, fitness and integrated antioxidant system in healthy active elderly women. *Int J Sports Med* 19, 462-467.

105. Koz M, Erbas D, Bilgihan A & Aricioglu A. (1992). Effects of acute swimming exercise on muscle and erythrocyte malondialdehyde, serum myoglobin, and plasma ascorbic acid concentrations. *Can J Physiol Pharmacol* 70, 1392-1395.
106. Kraemer WJ. (1988). Endocrine responses to resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 20, S152-157.
107. Kraemer WJ, Marchitelli L, Gordon SE, Harman E, Dziados JE, Mello R, Frykman P, McCurry D & Fleck SJ. (1990). Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. *J Appl Physiol* 69, 1442-1450.
108. Krinsky NI & Deneke SM. (1982). Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J Natl Cancer Inst* 69, 205-210.
109. Krotkiewski M & Brzezinska Z. (1996). Lipid peroxides production after strenuous exercise and in relation to muscle morphology and capillarization. *Muscle Nerve* 19, 1530-1537.
110. Kujala UM, Alen M & Huhtaniemi IT. (1990). Gonadotrophin-releasing hormone and human chorionic gonadotrophin tests reveal that both hypothalamic and testicular endocrine functions are suppressed during acute prolonged physical exercise. *Clin Endocrinol (Oxf)* 33, 219-225.
111. Kuoppasalmi K, Naveri H, Harkonen M & Adlercreutz H. (1980). Plasma cortisol, androstenedione, testosterone and luteinizing hormone in running exercise of different intensities. *Scand J Clin Lab Invest* 40, 403-409.
112. Kushnareva Y, Murphy AN & Andreyev A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 368, 545-553.
113. Lehmann M, Baumgartl P, Wiesenack C, Seidel A, Baumann H, Fischer S, Spori U, Gendrisch G, Kaminski R & Keul J. (1992). Training-overtraining: influence of a defined increase in training volume vs training intensity on performance, catecholamines and some metabolic parameters in experienced middle- and long-distance runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64, 169-177.

-
114. Lenaz G. (2001). The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 52, 159-164.
115. Liochev SI & Fridovich I. (1994). The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 16, 29-33.
116. López Chicharro JLA, J.C. (1991). El umbral anaeróbico. Interamericana, España.
117. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M & Belcastro AN. (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56, 313-316.
118. Lozano JA. (2000). Metabolismo de hidratos de carbono. In *Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud*, 2 edn, pp. 143-166. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
119. Lucia A, Diaz B, Hoyos J, Fernandez C, Villa G, Bandres F & Chicharro JL. (2001). Hormone levels of world class cyclists during the Tour of Spain stage race. *Br J Sports Med* 35, 424-430.
120. Luger A, Deuster PA, Kyle SB, Gallucci WT, Montgomery LC, Gold PW, Loriaux DL & Chrousos GP. (1987). Acute hypothalamic-pituitary-adrenal responses to the stress of treadmill exercise. Physiologic adaptations to physical training. *N Engl J Med* 316, 1309-1315.
121. Makras P, Koukoulis GN, Bourikas G, Papatheodorou G, Bedevis K, Menounos P, Pappas D & Kartalis G. (2005). Effect of 4 weeks of basic military training on peripheral blood leucocytes and urinary excretion of catecholamines and cortisol. *J Sports Sci* 23, 825-834.
122. Manna I, Jana K & Samanta PK. (2004). Intensive swimming exercise-induced oxidative stress and reproductive dysfunction in male wistar rats: protective role of alpha-tocopherol succinate. *Can J Appl Physiol* 29, 172-185.

123. Manoharan M & Schwille PO. (1994). Measurement of ascorbic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. Results in healthy subjects and patients with idiopathic calcium urolithiasis. *J Chromatogr B Biomed Appl* 654, 134-139.
124. Martin CL, Duclos M, Aguerre S, Mormede P, Manier G & Chaouloff F. (2000). Corticotropic and serotonergic responses to acute stress with/without prior exercise training in different rat strains. *Acta Physiol Scand* 168, 421-430.
125. Marx JO, Ratamess NA, Nindl BC, Gotshalk LA, Volek JS, Dohi K, Bush JA, Gomez AL, Mazzetti SA, Fleck SJ, Hakkinen K, Newton RU & Kraemer WJ. (2001). Low-volume circuit versus high-volume periodized resistance training in women. *Med Sci Sports Exerc* 33, 635-643.
126. Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L & Della Valle G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lacticidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 37, 235-239.
127. Mason RP. (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. In *Free radicals Biology*, ed. Pryor WA, pp. 262-265. Academic Press, New York.
128. Mastaloudis A, Leonard SW & Traber MG. (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 31, 911-922.
129. Mates JM, Perez-Gomez C & Nunez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603.
130. Maynar M, Caballero MJ, Mena P, Rodriguez C, Cortes R & Maynar JI. (1994). Urine excretion of androgen hormones in professional racing cyclists. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 68, 200-204.
131. McBride JM, Kraemer WJ, Triplett-McBride T & Sebastianelli W. (1998). Effect of resistance exercise on free radical production. *Med Sci Sports Exerc* 30, 67-72.

132. McColl EM, Wheeler GD, Gomes P, Bhambhani Y & Cumming DC. (1989). The effects of acute exercise on pulsatile LH release in high-mileage male runners. *Clin Endocrinol (Oxf)* 31, 617-621.
133. McCord JM & Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte superoxide (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-6055.
134. Mena P, Maynar M, Gutierrez JM, Maynar J, Timon J & Campillo JE. (1991). Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. *Int J Sports Med* 12, 563-566.
135. Mero A, Pitkanen H, Oja SS, Komi PV, Pontinen P & Takala T. (1997). Leucine supplementation and serum amino acids, testosterone, cortisol and growth hormone in male power athletes during training. *J Sports Med Phys Fitness* 37, 137-145.
136. Metin G, Atukeren P, Alturfan AA, Gulyasar T, Kaya M & Gumustas MK. (2003a). Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals in young male footballers. *Yonsei Med J* 44, 979-986.
137. Metin G, Gumustas MK, Uslu E, Belce A & Kayserilioglu A. (2003b). Effect of regular training on plasma thiols, malondialdehyde and carnitine concentrations in young soccer players. *Chin J Physiol* 46, 35-39.
138. Meydani M, Evans WJ, Handelman G, Biddle L, Fielding RA, Meydani SN, Burrill J, Fiatarone MA, Blumberg JB & Cannon JG. (1993). Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am J Physiol* 264, R992-998.
139. Minetto MA, Lanfranco F, Baldi M, Termine A, Kuipers H, Ghigo E & Rainoldi A. (2007). Corticotroph axis sensitivity after exercise: comparison between elite athletes and sedentary subjects. *J Endocrinol Invest* 30, 215-223.
140. Monboisse JC, Gardes-Albert M, Randoux A, Borel JP & Ferradini C. (1988). Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis. *Biochim Biophys Acta* 965, 29-35.

141. Moncada S & Higgs EA. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21, 361-374.
142. Morillas-Ruiz J, Zafrilla P, Almar M, Cuevas MJ, Lopez FJ, Abellan P, Villegas JA & Gonzalez-Gallego J. (2005). The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists. *Eur J Appl Physiol* 95, 543-549.
143. Mumby S, Chaturvedi R, Brierley J, Lincoln C, Petros A, Redington A & Gutteridge JM. (1999). Antioxidant protection against iron toxicity: plasma changes during cardiopulmonary bypass in neonates, infants, and children. *Free Radic Res* 31, 141-148.
144. Newmark ST, Himathongkam T, Martin RP, Cooper KH & Rose LI. (1976). Adrenocortical response to marathon running. *J Clin Endocrinol Metab* 42, 393-394.
145. 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.
146. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H & Gotoh N. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 62, 1322S-1326S.
147. Nindl BC, Kraemer WJ, Deaver DR, Peters JL, Marx JO, Heckman JT & Loomis GA. (2001). LH secretion and testosterone concentrations are blunted after resistance exercise in men. *J Appl Physiol* 91, 1251-1258.
148. Nishikaze O & Furuya E. (1998). [Stress and anticortisols--17-ketosteroid sulfate conjugate as a biomarker in tissue repair and recovery]. *J Uoeh* 20, 273-295.
149. Nishikaze O & Furuya E. (2000). [Coping with stress in the elderly]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 37, 68-73.
150. Noberasco G, Odetti P, Boeri D, Maiello M & Adezati L. (1991). Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed Pharmacother* 45, 193-196.

151. North JA, Spector AA & Buettner GR. (1994). Cell fatty acid composition affects free radical formation during lipid peroxidation. *Am J Physiol* 267, C177-188.
152. Ortenblad N, Madsen K & Djurhuus MS. (1997). Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am J Physiol* 272, R1258-1263.
153. Packer JE, Slater TF & Willson RL. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278, 737-738.
154. Packer L. (1994). Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts. *Ann N Y Acad Sci* 738, 257-264.
155. Palace VP, Khaper N, Qin Q & Singal PK. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 26, 746-761.
156. Palozza P, Luberto C, Calviello G, Ricci P & Bartoli GM. (1997). Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure. *Free Radic Biol Med* 22, 1065-1073.
157. Pantaleoni M, Barini A, Valerio L, Zizzo G, Coletta F & Velardo A. (1991). [Changes in the blood levels of adrenal hormones after prolonged physical activity]. *Minerva Endocrinol* 16, 17-20.
158. Petraglia F, Barletta C, Facchinetti F, Spinazzola F, Monzani A, Scavo D & Genazzani AR. (1988). Response of circulating adrenocorticotropin, beta-endorphin, beta-lipotropin and cortisol to athletic competition. *Acta Endocrinol (Copenh)* 118, 332-336.
159. Poderoso JJ, Lisdero C, Schopfer F, Riobo N, Carreras MC, Cadenas E & Boveris A. (1999). The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem* 274, 37709-37716.

160. Ponjee GA, De Rooy HA & Vader HL. (1994). Androgen turnover during marathon running. *Med Sci Sports Exerc* 26, 1274-1277.
161. Poor V, Juricskay S & Telegdy E. (2002). Urinary steroids in men with male-pattern alopecia. *J Biochem Biophys Methods* 53, 123-130.
162. Porta J, Galiano D, Tejedo A & González J M. (1993). Valoración de la composición corporal. Utopías y realidades. In *Manual de Cineantropometría*, pp. 113-170. Monografías FEMEDE, Pamplona.
163. Prasad TK, Anderson MD & Stewart CR. (1994). Acclimation, Hydrogen Peroxide, and Abscisic Acid Protect Mitochondria against Irreversible Chilling Injury in Maize Seedlings. *Plant Physiol* 105, 619-627.
164. Pucsok JM, Gyore I, Hollosi I, Soos E, Ali Ghasemi NR & Frenkl R. (2005). Urine steroid profile of judo competitors affected by acute physical exercises. *J Chromatogr Sci* 43, 438-440.
165. Ramel A, Wagner KH & Elmadfa I. (2004a). Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men. *Br J Sports Med* 38, E22.
166. Ramel A, Wagner KH & Elmadfa I. (2004b). Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *Eur J Nutr* 43, 2-6.
167. Reilly PM & Bulkley GB. (1990). Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg* 77, 1323-1324.
168. Ricciarelli R, Zingg JM & Azzi A. (2001). Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *Faseb J* 15, 2314-2325.
169. Rivero-Marabe JJ, Maynar-Marino JI, Garcia-de-Tiedra MP, Galan-Martin AM, Caballero-Loscos MJ & Maynar-Marino M. (2001). Determination of natural corticosteroids in urine samples from sportsmen. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 761, 77-84.

170. Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Briones A, Baena AB, Marin E, Salaices M & Marin J. (1999). Changes in plasma oxidative state with age and their influence on contractions elicited by noradrenaline in the rat tail artery. *Life Sci* 65, 915-924.
171. Rokitzki L, Logemann E, Sagredos AN, Murphy M, Wetzel-Roth W & Keul J. (1994). Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. *Acta Physiol Scand* 151, 149-158.
172. Ronsen O, Haug E, Pedersen BK & Bahr R. (2001). Increased neuroendocrine response to a repeated bout of endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 33, 568-575.
173. Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen US, Mannino S & Milunsky A. (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 333, 1369-1373.
174. Satchek JM & Blumberg JB. (2001). Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. *Nutrition* 17, 809-814.
175. Satchek JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R & Blumberg JB. (2003). Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med* 34, 1575-1588.
176. Santangelo L, Cigliano L, Montefusco A, Spagnuolo MS, Nigro G, Golino P & Abrescia P. (2003). Evaluation of the antioxidant response in the plasma of healthy or hypertensive subjects after short-term exercise. *J Hum Hypertens* 17, 791-798.
177. Schurmeyer T, Jung K & Nieschlag E. (1984). The effect of an 1100 km run on testicular, adrenal and thyroid hormones. *Int J Androl* 7, 276-282.
178. Schwab R, Johnson GO, Housh TJ, Kinder JE & Weir JP. (1993). Acute effects of different intensities of weight lifting on serum testosterone. *Med Sci Sports Exerc* 25, 1381-1385.
179. Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Kocer G, Ozkaya YG, Yesilkaya A, Bor-Kucukatay M, Uyklu M, Yalcin O & Baskurt OK. (2005a). Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol* 99, 1434-1441.

180. Senturk UK, Yalcin O, Gunduz F, Kuru O, Meiselman HJ & Baskurt OK. (2005b). Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects. *J Appl Physiol* 98, 1272-1279.
181. Shacter E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32, 307-326.
182. Shearer MJ. (1986). *Vitamins. HPLC of small molecules, a practical approach*. IRL Press, Oxford.
183. Shigenaga MK, Gimeno CJ & Ames BN. (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9697-9701.
184. Shigenaga MK, Hagen TM & Ames BN. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10771-10778.
185. Shing CM, Peake JM, Ahern SM, Strobel NA, Wilson G, Jenkins DG & Coombes JS. (2007). The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 677-685.
186. Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215, 213-219.
187. Sies H & Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311, 617-631.
188. Sies H & Stahl W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62, 1315S-1321S.
189. Simon JA & Hudes ES. (2000). Serum ascorbic acid and gallbladder disease prevalence among US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Arch Intern Med* 160, 931-936.

190. Simonian NA & Coyle JT. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 83-106.
191. Sjodin B, Hellsten Westing Y & Apple FS. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10, 236-254.
192. Stadtman ER. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.
193. Strauss RH, Lanese RR & Malarkey WB. (1985). Weight loss in amateur wrestlers and its effect on serum testosterone levels. *Jama* 254, 3337-3338.
194. Stupnicki R, Obminski Z, Klusiewicz A & Viru A. (1995). Pre-exercise serum cortisol concentration and responses to laboratory exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 71, 439-443.
195. Suay F, Salvador A, Gonzalez-Bono E, Sanchis C, Martinez M, Martinez-Sanchis S, Simon VM & Montoro JB. (1999). Effects of competition and its outcome on serum testosterone, cortisol and prolactin. *Psychoneuroendocrinology* 24, 551-566.
196. Sundquist AR, Briviba K & Sies H. (1994). Singlet oxygen quenching by carotenoids. *Methods Enzymol* 234, 384-388.
197. Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Cases N, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA & Pons A. (2005). Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic Res* 39, 1317-1324.
198. Surmen-Gur E, Ozturk E, Gur H, Punduk Z & Tuncel P. (1999). Effect of vitamin E supplementation on post-exercise plasma lipid peroxidation and blood antioxidant status in smokers: with special reference to haemoconcentration effect. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 79, 472-478.
199. Tauler P, Aguilo A, Guix P, Jimenez F, Villa G, Tur JA, Cordova A & Pons A. (2005). Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. *J Sports Sci* 23, 5-13.

200. Tegelman R, Carlstrom K & Pousette A. (1990). Hormone levels in male ice hockey players during the night after a 26-hour cup tournament. *Andrologia* 22, 261-268.
201. Timon Andrada R, Maynar Marino M, Munoz Marin D, Olcina Camacho GJ, Caballero MJ & Maynar Marino JI. (2007). Variations in urine excretion of steroid hormones after an acute session and after a 4-week programme of strength training. *Eur J Appl Physiol* 99, 65-71.
202. Tremblay MS, Copeland JL & Van Helder W. (2005). Influence of exercise duration on post-exercise steroid hormone responses in trained males. *Eur J Appl Physiol* 94, 505-513.
203. Ueki M & Okano M. (1999). Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13, 2237-2243.
204. Umegaki K, Daohua P, Sugisawa A, Kimura M & Higuchi M. (2000). Influence of one bout of vigorous exercise on ascorbic acid in plasma and oxidative damage to DNA in blood cells and muscle in untrained rats. *J Nutr Biochem* 11, 401-407.
205. Urhausen A, Gabriel H & Kindermann W. (1995). Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med* 20, 251-276.
206. Uusitalo AL, Huttunen P, Hanin Y, Uusitalo AJ & Rusko HK. (1998). Hormonal responses to endurance training and overtraining in female athletes. *Clin J Sport Med* 8, 178-186.
207. Vani M, Reddy GP, Reddy GR, Thyagaraju K & Reddanna P. (1990). Glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, xanthine oxidase, catalase, glutathione peroxidase and lipid peroxidation in the liver of exercised rats. *Biochem Int* 21, 17-26.
208. Viguie CA, Frei B, Shigenaga MK, Ames BN, Packer L & Brooks GA. (1993). Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* 75, 566-572.

-
209. Viitala PE, Newhouse IJ, LaVoie N & Gottardo C. (2004). The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. *Lipids Health Dis* 3, 14.
210. Vina J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardo FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS & Repine JE. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life* 49, 539-544.
211. Vina JR, Palacin M, Puertes IR, Hernandez R & Vina J. (1989). Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *Am J Physiol* 257, E916-922.
212. Viru AM, Hackney AC, Valja E, Karelson K, Janson T & Viru M. (2001). Influence of prolonged continuous exercise on hormone responses to subsequent exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 85, 578-585.
213. Vuorimaa T, Vasankari T, Mattila K, Heinonen O, Hakkinen K & Rusko H. (1999). Serum hormone and myocellular protein recovery after intermittent runs at the velocity associated with VO(2max). *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80, 575-581.
214. Wagner BA, Buettner GR & Burns CP. (1994). Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* 33, 4449-4453.
215. Weiss LW, Cureton KJ & Thompson FN. (1983). Comparison of serum testosterone and androstenedione responses to weight lifting in men and women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 50, 413-419.
216. Whatley SA, Curti D, Das Gupta F, Ferrier IN, Jones S, Taylor C & Marchbanks RM. (1998). Superoxide, neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome b5 reductases in brain and lymphocytes from normals and schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 3, 227-237.

217. Wheeler GD, Singh M, Pierce WD, Epling WF & Cumming DC. (1991). Endurance training decreases serum testosterone levels in men without change in luteinizing hormone pulsatile release. *J Clin Endocrinol Metab* 72, 422-425.
218. Wilmore JH & Costill DL. (1998). *Fisiología del esfuerzo y del deporte*. Paidotribo, Barcelona.
219. Xiao GQ & Li HC. (2006). Effects of inhalation of oxygen on free radical metabolism and oxidative, antioxidative capabilities of the erythrocyte after intensive exercise. *Res Sports Med* 14, 107-115.
220. Yalcin O, Bor-Kucukatay M, Senturk UK & Baskurt OK. (2000). Effects of swimming exercise on red blood cell rheology in trained and untrained rats. *J Appl Physiol* 88, 2074-2080.
221. Yap BK, Kazlauskas R, Elghazi K, Johnston GA & Weatherby RP. (1996). Profiling of urinary testosterone and luteinizing hormone in exercise-stressed male athletes, using gas chromatography-mass spectrometry and enzyme immunoassay techniques. *J Chromatogr B Biomed Appl* 687, 117-125.