BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Universidad de Granada

Efectos del *Flebodium decumanum* en el estrés oxidativo y la disfunción inmune provocado por el ejercicio físico extenuante

Edgardo Molina Sotomayor

Tesis de Doctorado

Escuela Universitaria de Enfermería

Director: Dr. D. Carlos de Teresa Galván

Codirectores: Dr. D. Rafael Guisado Barrilao
Dr. D. Jesús Rodríguez Huertas

2002

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE ENFERMERIA

BIBLIOTECA VIRTUAL

EFECTOS DEL PHLEBODIUM DECUMANUM SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO Y LA DISFUNCIÓN INMUNE PROVOCADOS POR EL EJERCICIO FISICO EXTENUANTE

TESIS DOCTORAL

EDGARDO MOLINA SOTOMAYOR

Granada, 2002

INDICE

Página

INTRODUCCION 17

CAPITULO 1
PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA 21

1.1. Adaptaciones músculo esquelético 23
1.2. El ejercicio físico en el mundo occidental 24
1.3. Patologías derivadas del sedentarismo 25
1.4. Adaptaciones cardiovasculares 26
1.5. Ejercicio físico y factores de riesgo coronario 27
1.6. Beneficios y riesgos del ejercicio físico 32
1.7. Otros efectos del ejercicio físico 35
1.8. Riesgos potenciales del ejercicio físico 36
1.9. Efecto inmunomodulador del *Pphlebodium decumanum* 41
1.10. Objetivos 42
1.11. Hipótesis experimentales 42
1.12. Hipótesis nulas 43

CAPITULO 2
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA 45

2.1 LA LOCOMOCIÓN COMO ADAPTACIÓN DEL SER HUMANO AL MEDIO AMBIENTE 47
2.2-ADAPTACIONES DE OTROS ÓRGANOS A LA CAPACIDAD DE LOCOMOCIÓN 48
2.3.ADAPTACIONES ENERGÉTICAS CELULARES VO_2 51
2.4. EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO 57
2.4.1. Radicales libres 57
2.4.2. Daño oxidativo sobre estructuras orgánicas 61
2.4.3. Daño de membranas 62
2.4.4. Daño del ADN y ARN 63
2.5. DISFUNCIÓN INMUNOLÓGICA 65
2.6. DAÑO NECRÓTICO Y APOPTÓTICO 67
2.7. MECANISMOS ANTIOXIDANTES: ENZIMÁTICOS Y NO ENZIMÁTICOS 68
2.8. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS 78
2.9. MANEJO Y PREVENCIÓN DE LA FATIGA 84
2.9.1. Antioxidantes 84
2.9.2. Inmunomoduladores 87

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

CAPITULO 3 METODOLOGIA 91

3.1. PROCESO DE MUESTREO 93
3.2. FORMACIÓN DE LOS GRUPOS Y CARACTERISTICAS 93
3.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES Y DE ADAPTACIÓN 94
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL 95
3.4.1. Programa de extenuación física 96
3.5. PRESENTACIÓN DE VARIABLES 97
3.6. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS 98
3.7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS CITOPLASMÁTICAS Y MEMBRANAS MITOCONDRIALES 99
3.7.1. Tejido hepático y miocárdico. 99
3.7.2. Tejido muscular. 99
3.8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS 99
3.9. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA 101
3.9.1. Hidroperóxidos (ROOH) 101
3.9.2. Ácido tiobarbitúrico (TBAR) 102
3.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD 103
3.10.1. Superóxido dismutasa (SOD) 103
3.10.2. Catalasa (CAT) 104
3.10.3. Glutation peroxidasa (GPX) 105
3.11. DETERMINACIÓN PLASMÁTICA DE COENZIMA Q_9 (COQ_9), VITAMINA E Y RETINOL 107
3.12. DETERMINACIÓN EN MEMBRANA MITOCONDRIAL DE UBIQUINONAS (COQ_9) Y VITAMINA E 107
3.13. DETERMINACIÓN DE CITOCROMOS ($a+a_3$, b, $c+c_1$) 108
3.14. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO OXIDASA 109
3.15. ANÁLISIS DE CITOQUINAS EN SUERO 110
3.16. TRATAMIENTO DE DATOS 111

CAPITULO 4
RESULTADOS 113

4.1. PESOS PONDERALES DE LOS ANIMALES 115
4.1.1. Ratas extenuadas (E) 115
4.1.2. Ratas extenuadas (E+PD)
4.2. PESOS DE LOS ÓRGANOS 116
4.2.1. Hígado 116
4.2.2. Músculo esquelético 117
4.2.3. Corazón 118
4.3. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA Y CITOPLASMÁTICAS 118
4.4. BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPIDICA 122
4.4.1. Concentraciones de hidroperóxidos (ROOH) 122

4.4.2. Concentraciones de TBARS 125
4.5. CONCENTRACIONES DE ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS EN PLASMA 127
4.5.1. Tocoferol (VE) 127
4.5.2. Retinol (VA) 128
4.5.3. Coenzima Q_9 (CoQ_9) 128
4.6. CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICOS EN MEMBRANA MITOCONDRIAL 129
4.6.1. Tocoferol (VE) 129
4.6.2. Retinol (VA) 131
4.6.3. Coenzima Q_9 (CoQ_9) 133
4.7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CITOPLASMATICA 136
4.7.1. Superóxido dismutasa (SOD) 136
4.7.2. Catalasa (CAT) 138
4.7.3. Glutation peroxidasa (GPX) 140
4.8. FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL 141
4.8.1. Citocromos $a+a_3$ 142
4.8.2. Citocromo b 144
4.8.3. Citocromos $c+c_1$ 146
4.9. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CITOCROMO OXIDASA 147
4.9.1. Hígado 148
4.9.2. Músculo esquelético 148
4.9.3. Corazón 149
4.10. TURNOVER DE LA CITODROMO OXIDASA 149
4.10.1. Hígado 149
4.10.2. Músculo esquelético 150
4.10.3. Corazón 150

CAPITULO 5
DISCUSIÓN DE RESULTADOS 151
5.1 PESOS DE ÓRGANOS. 159
5.1.1 Hígado. 159
5.1.2 Músculos esqueléticos 160
5.1.3 Corazón 162
5.2 PEROXIDACION LIPIDICA 163
5.2.1 ROOH de hígado 163
5.2.2 ROOH de músculo esquelético 164
5.2.3 ROOH de corazón 166
5.2.4 TBAR de hígado 167
5.2.5 TBAR de músculo esquelético 169
5.2.6 TBAR de corazón. 171
5.3 ANTIOXIDANTES PLASMA 172
5.3.1 Tocoferol (VE), Retinol (VA), Coenzima Q_9 (CoQ_9). 172
5.4 ANTIOXIDANTES EN MEMBRANA MITOCONDRIAL 174
5.4.1 Tocoferol (VE) en hígado 174

5.4.2 Tocoferol (VE) en músculo esquelético 176
5.4.3 Tocoferol (VE) en corazón 177
5.4.4 Retinol (VA) en hígado 178
5.4.5 Retinol (VA) en músculo esquelético 179
5.4.6 Retinol (VA) en corazón 179
5.4.7 Coenzina Q_9 en hígado 179
5.4.8 Coenzima Q_9 en músculo esquelético 181
5.4.9 Coenzima Q_9 en corazón 182
5.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE 184
5.5.1 Superóxido dismutasa (SOD) de hígado 184
5.5.2 Superóxido dismutasa (SOD) corazón y músculo esquelético. 185
5.5.3 Catalasa (CAT) hígado y corazón 187
5.5.4 Catalasa (CAT) músculo esquelético 188
5.5.5 Glutation peroxidasa (GPX) de hígado y músculo esquelético 190
5.5.6 Glutation peroxidasa (GPX) de corazón 192
5.6 FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL 197
5.6.1 Hígado 197
5.6.2 Músculo esquelético 199
5.6.3 Corazón 202

CONCLUSION 205
BIBLIOGRAFIA 209
ANEXOS 243
RESUMEN

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Dedicada a mi compañero y amigo, mi hijo... Felipe
a mis padres que tanto amo, que Dios los acompañe...

PROLOGO

Desde hace aproximadamente 20 años que vengo relacionándome con el mundo de la actividad física, tanto en el terreno mismo como en lo teórico, y siempre e indistintamente cual sea el objetivo de un programa de entrenamiento físico, está presente como objetivo fundamental el mejoramiento de la capacidad aeróbica y específicamente el incremento del consumo máximo de oxígeno.

Aeróbico es una palabra griega que significa "aire-cambio vivo". Así pues, el metabolismo aeróbico es un proceso mediante el cual el cuerpo cambia, transforma el oxígeno en energía, gracias al cual, cada célula puede cumplir con su cometido. De esta manera entonces el oxígeno se convierte en nuestra fuente de energía vital.

Si bien es cierto la oxidación produce energía, también genera productos residuales como son las especies reactivas de oxígeno, ya que, durante el ejercicio este metabolismo oxidativo aumenta. Se sabe que, entre el 4 y 5% del oxigeno consumido por la respiración celular, no se transforma en agua, sino que forman los radicales libres.

También estas especies reactivas del oxígeno se originan por varias otras fuentes intracelulares, una de ellas es, la respuesta al daño muscular secundario producido por la sobreejercitación. Cuando la protección natural antioxidante es sobrepasada estas lesiones pueden llevar, eventualmente, a la muerte celular.

Con este estudio no he pretendido cuestionar el valor del ejercicio físico y especialmente aquellos basados en el principio aeróbico, ya que el oxígeno en sí, no es un elemento toxico, pero sí lo son los productos residuales que aparecen cuando aquel, es consumido por el organismo, mediante el metabolismo.

Son muchos los trabajos y autores que se encuentran en la bibliografía que hablan a favor de los beneficios de la actividad física para la salud. No obstante, a juicio del autor de este trabajo, el ejercicio físico debidamente controlado, planificado y evaluado es el que debe ser propuesto y utilizado para prevenir o coadyuvar al incremento de la salud de las personas. De lo contrario me temo que más que contribuir a mejorarla, la estaremos vulnerando.

Además de una debida prescripción del ejercicio, es importante que los profesionales de la especialidad y de áreas afines, junto a los usuarios de estos programas físicos, conozcan lo importante que es el aumento de la ingesta de

antioxidantes, para apoyar al sistema inmunológico con los medios naturales y destructores de las especies reactivas del oxígeno.

Para fomentar eficazmente esta actividad de defensa antioxidante, debemos contar con determinados minerales, para la síntesis de estos componentes. Si los antioxidantes no están disponibles en las cantidades adecuadas, nuestro sistema de defensa se verá comprometido y será incapaz de afrontar la carga tóxica. Por lo tanto, cuanto mayor sea el consumo de oxigeno a una carga dada de trabajo, mayor será la necesidad de antioxidantes.

Ante tal evidencia, el aporte de este trabajo va dirigido a orientar hacia una practica más segura del ejercicio físico, y a la búsqueda de un antioxidantes exógeno que refuerce las barreras de defensas naturales de nuestro organismo ante el estrés oxidativo, inducido por los intensos y altos volúmenes de trabajos físicos crónicos a que se ven expuesto muchos deportistas y sujetos activos.

La búsqueda de nuevos antioxidantes naturales podría llevar a identificar y aislar estructuras químicas con efectos preventivos y terapéuticos mayores a los ya conocidos, o que operen por otros mecanismos más novedosos o eficientes y sin efectos secundarios. Se sabe, por ejemplo, que los vegetales son fuentes de nuevos y más eficaces antioxidantes, a los que la farmacología puede recurrir para neutralizar los radicales libres producidos por las células, a causa del metabolismo y de su incremento, los que han sido vinculados a diversas enfermedades.

La contribución de este estudio ha sido experimentar y dar a conocer los resultados encontrados sobre los efectos inmunomoduladores de una planta que es un helecho: el Phlebodiun decumanum (PD). Dicho estudio se basó en el efecto de la misma sobre diferentes tejidos de animales expuestos a un incremento excesivo del metabolismo in vivo. Hay evidencias experimentales que apoyan la idea de que el PD tiene una eficacia terapéutica sobre los procesos inflamatorios.

El descubrimiento de que sus compuestos activos actúen sobre la supresión del sistema inmune y la producción de especies reactivas del oxígeno durante el ejercicio extenuante y crónico, constituiría una nueva vía de protección no dopante. Ello daría una mayor justificación a los esfuerzos por todos nosotros a continuar con esta línea de investigación para proteger la salud como también a la conservación de los ecosistemas a las que estos helechos pertenecen.

El autor de este trabajo, al llegar al final de este proceso de investigación para la obtención de su grado de Doctor, quiere hacer propicia esta

oportunidad para agradecer infinitamente a todos y a quienes han sido los responsables de guiarme en esta apasionante línea de investigación que tiene relación con la paradoja del oxígeno.

Enhorabuena, el haber conocido y trabajado con quienes han sido mis Directores de Tesis, profesionales comprometidos en contribuir con sus aportes a mejorar la salud y el bienestar de las personas. Sin lugar a dudas que ha sido, lo más significativo que me ha sucedido este último tiempo, el poder sumarme a sus investigaciones y contribuir desde mi especialidad profesional, a los grandes esfuerzos que, como ellos, hacen muchas otros profesionales, instituciones y hasta gobiernos por una mejor calidad de vida de sus habitantes.

Primero quisiera manifestar mi más profundo agradecimiento a mis Directores de Tesis, a los señores, Prof. Dr. D Carlos de Teresa Galván, Prof. Dr. D Rafael Guisado Barrilao y Prof. Dr. D Jesús Rodríguez Huerta por sus conocimientos, preocupación y permanente apoyo recibido para la elaboración de esta Tesis Doctoral. Quiero manifestarle a ustedes señores directores, maestros y amigos que, vuestros consejos y vuestras enseñanzas guiarán siempre mi vida profesional y, en lo personal, aún a la distancia, serán siempre recordados con un sentimiento de gratitud y también de mucha nostalgia. Por todo lo que ustedes para mí representan y por vuestra amistad, gracias, muchas gracias....

En especial quiero dejar testimonio de mis mas sinceros agradecimientos al Prof. Dr. Carlos de Teresa Galván por ser más que un guía un amigo, por su persistencia y paciencia con este autor durante la realización de la presente investigación, por la ilusión que me ha despertado por este trabajo. Gracias Doctor, por orientarme y permitirme compartir la aventura de vuestra apasionante línea de investigación y, gracias nuevamente por su permanente e inagotable preocupación hasta el final de esta experiencia...

Al Centro de Medicina del Deporte del Hospital San Juan de Dios a su Director y a todo su personal a cargo, en especial en la persona del señor D. Rafael Navarro Montes por su permanente ayuda incondicional en la elaboración del presente texto y a sus permanentes demostraciones de colaboración y amistad. Gracias...Rafa por tu hospitalidad y ayuda que siempre será muy valorada por mí.

A mis profesoras en el trabajo de laboratorio a Yolanda, Susana y Olga por su dedicación y colaboración en las enseñanzas de las mas variadas técnicas de laboratorios. A ustedes por su ayuda y paciencia muchas gracias...

Agradecer al Lic. Eduardo de Araujo Nepomuceno quien fue mi compañero de trabajo y con quien compartí muchas horas de laboratorio tanto

en días hábiles como festivos, nuestra cita fue siempre junto a nuestros animales. Gracias Eduardo por tu ayuda, tu colaboración y por darme la posibilidad de aprender de ti.

También agradecer en la persona del Prof. Dr. D José Quiles Morales y a su señora esposa la Prof. Dra. Doña María del Carmen Ramírez Tortosa por sus consejos siempre oportunos y por su ayuda incondicional en el trabajo de laboratorio. Mis agradecimientos para ambos y en especial al Dr. Quiles por transmitirme además toda su experiencia.

Agradecer también al Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos en la persona de su Director el Prof. Dr. D José Mataix Verdú y a todo su equipo de investigación docente, personal administrativo y de servicios por todas las atenciones recibidas durante mi permanencia en sus instalaciones.

Al Departamento Enfermería de la Universidad de Granada en la persona de la Prof. Dra. Doña Carmen Villaverde por orientarme y ayudarme a iniciar el presente estudio.

Al Prof. Dr. D Antonio Alcaide Director científico de Exply project por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Al Prof. Dr. D Manuel Fresno del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid. Por su colaboración en la determinación de parámetros inmunológicos.

Por último a la empresa Helsint S.A.L., mis agradecimientos en la persona de su Director el señor D Miguel Yesares por su colaboración en la realización de este estudio, al permitirme investigar con su producto, el Phlebodium decumanum sin el cual, no habría sido posible llevarlo a cabo...

Gracias a todos

INTRODUCCIÓN

Hace 4600 millones de años se creó nuestro sistema solar. La ausencia de ozono y oxígeno en nuestro planeta permitieron la transmisión de energía de las radiaciones ultravioletas solares sobre compuestos orgánicos como el agua, dióxido de carbono y amonio, proporcionándoles energía suficiente para realizar la fotosíntesis *(1)*.

Estos procesos, que permitieron la síntesis de moléculas como la glucosa, están claramente datados hace 3.500 millones de años. Por ello, una vez aparecidos los primeros microorganismos, éstos utilizaron como vía de producción de energía la fermentación anaeróbica o glucólisis, considerada así como la vía más antigua de extracción de energía en nuestro planeta. Los organismos más primitivos descomponían el agua mediante fotosíntesis, en cuyo proceso se liberaba oxígeno a la atmósfera de forma progresiva. Probablemente se necesitaron más de 2000 millones de años para que se creara una atmósfera en la que una quinta parte de las moléculas fueran oxígeno *(1)(2)*.

Posteriormente, la pluricelularidad de los seres vivos precisó en su evolución del desarrollo de nuevas vías de resíntesis del ATP celular, desarrollándose las vías aeróbicas como adaptación más evidente al medioambiente, dada la abundancia de oxígeno en la atmósfera *(3)*. De este modo, la evolución conllevó la aparición de nuevos mecanismos que produjeran y transportaran la energía necesaria para cada célula. Esto supuso la creación de un medio acuoso interno como adaptación de la pluricelularidad, para reproducir las condiciones de los organismos unicelulares más primitivos *(4)*.

De este modo los seres vivos en su evolución fueron modificando su morfología y funcionalidad como medio de adaptación al medio para sobrevivir. Así, la evolución de las especies en la tierra se puede considerar como un fenómeno de "ensayo-error" en el que solo sobrevivían aquellos ensayos que se adaptaban a las condiciones del ambiente *(2)*.

En cualquier caso, una de las adaptaciones más importantes fue la de la utilización del oxígeno como fuente de energía. Por ello, los seres que sobrevivieron fueron aquellos que desarrollaron vías de producción de energía mediante la utilización del oxígeno, tan abundante y disponible en aquel medio, y que además también desarrollaron medios de protección frente a los daños derivados de dichos procesos *(3)*.

El siguiente paso en la evolución de los seres multicelulares supuso la adición de la capacidad de desplazamiento, debido a la necesidad de procurarse nuevas fuentes de alimento especialmente con fines estructurales

(5). Dicho desarrollo supuso a la larga la aparición de un sistema músculo-esquelético de locomoción, íntimamente relacionado con el resto de sistemas orgánicos. De este modo todos los sistemas tuvieron que adaptarse a sus nuevas exigencias tanto energéticas como estructurales *(1)*.

Así, el sistema circulatorio se desarrolló conjuntamente con el músculo esquelético para cubrir sus nuevos requerimientos; el digestivo hizo lo propio ante la necesidad de nuevas ingestas alimenticias, etc.*(3·)(5)* Y además se debían desarrollar adaptaciones frente a las posibles respuestas perjudiciales que todos estos sistemas pudieran desencadenar contra el propio organismo, cuyo caso más evidente fue el de las defensas antioxidantes frente a la acción potencialmente dañina del oxígeno y la producción de radicales libres durante su metabolización..

Inicialmente la obtención de energía mediante las vías aeróbicas no comportaba ninguna reacción peligrosa para los organismos poco desarrollados, el aumento del consumo de O_2 en los más desarrollados hizo que solamente sobrevivieran aquellos que también desarrollaron mecanismos de protección frente al aumento de la producción de especies derivadas del oxígeno (radicales libres) al incrementarse el consumo de O_2 *(5)*.

De hecho, el oxígeno durante su metabolización da lugar a la producción de moléculas muy reactivas (radicales libres) debido a la presencia de un electrón desapareado en la última capa que le hace reaccionar muy fácilmente con distintas moléculas, lo que a nivel de las membranas reduce la capacidad de producir energía y contribuye a desarrollar los procesos de envejecimiento *(6)*. Aunque durante la evolución se han ido desarrollando mecanismos de antioxidación para contrarrestar estos efectos deletéreos, finalmente los procesos relacionados con la combustión del oxígeno son los que determinan principalmente el envejecimiento *(5)(6)*.

En los últimos años se ha registrado gran interés por los radicales libres y la función que cumplen en el organismo. Los radicales libres pueden ser formados tanto por la pérdida como por la ganancia de un electrón *(7)*. En el primer caso se trata una oxidación y en el segundo, de una reducción. También se forman radicales cuando se rompe la unión covalente entre dos átomos, de modo que los dos electrones que son compartidos por la unión se separan, y queda uno en cada átomo *(7)(8)*.

Sea cual fuese el mecanismo de la formación de un radical, el electrón en más o menos desestabiliza al átomo, ya que aumenta su contenido energético y lo torna muy reactivo. Como su tendencia espontánea es volver al estado de menor energía, cediendo o recibiendo electrones, reacciona

rápidamente con otros átomos o moléculas que se encuentran cerca. Uno de los radicales libres que se producen normalmente en los seres vivos es el O_2.- denominado radical superóxido, que consiste en una molécula de oxígeno que ha adquirido un electrón adicional *(7)*.

Este radical libre es uno de los productos finales de la respiración celular, la cual tiene lugar en las mitocondrias, corpúsculos que se encuentran en el interior de las células. Durante dicha respiración, la mayor parte del oxígeno que llega a las mitocondrias es completamente reducido, es decir que adquiere electrones y se transforma en agua *(8)*. Sin embargo, aproximadamente un 5% del oxígeno se reduce sólo parcialmente, con la consecuente producción del radical superóxido. Esta especie reactiva puede, a su vez, originar otros radicales libres *(9)*.

Los radicales libres son extremadamente inestables y de corta vida. Cualquier molécula que se encuentre en su vecindad inmediata se verá afectada y se transformará, a su vez, en un radical libre, lo que desata una reacción en cadena *(7)(8)(9)*. Cuando tales especies activas se producen en la membrana celular, predomina la reacción en cadena de la lipoperoxidación, proceso por el cual se oxidan o sea, ceden sus electrones a los radicales las moléculas de ácidos grasos, principales componentes de las membranas celulares con el consecuente daño a éstas. En determinadas circunstancias, la producción de radicales libres puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida como *estrés oxidativo (10)*.

La producción de oxidantes es un fenómeno constante como consecuencia de la adaptación de los organismos al estado de aerobiosis. Normalmente, el daño celular que puede producir estas especies reactivas del oxígeno es controlado por los antioxidantes enzimáticos y compuestos no proteicos *(9)*. Pero la protección que confiere estas sustancias y enzimas es limitada y puede ser sobrepasada por diversas situaciones que generan estrés oxidativo, como son, el aumento de la concentración de oxígeno, los efectos de compuestos exógenos, estados inflamatorios, la activación de enzimas productoras de radicales libres y la presencia de peroxinitritos *(10)*.

Durante el ejercicio aumentan los requerimientos de oxígeno, este aumento en el consumo de oxígeno hace que aumente también la formación de radicales libres, y por tanto las posibilidades de lesión celular causado por estrés oxidativo, a no ser que se consiga una elevada efectividad del sistema antioxidante *(10)(11)*.

Los radicales libres, que se producen durante el ejercicio, son especies químicas altamente reactivas, que generan reacciones descontroladas que resultan en entrecruzamiento de las cadenas del ADN, proteínas y lípidos en la misma molécula o entre moléculas. También pueden provocar daños

oxidativos en importantes grupos funcionales de las biomoléculas, acelerando el envejecimiento y las enfermedades que lo acompañan *(12)*.

Su acción también se ejerce sobre los leucocitos favoreciendo su activación anómala. Todo ello, origina un daño muscular acompañado de la infiltración inflamatoria, que conduce a una disminución de la función de las fibras así como a su sufrimiento con la liberación de enzimas musculares, con cambios histológicos evidentes *(11)*. Como consecuencia del estado inflamatorio como respuesta a la lesión inicial causada por el oxígeno en el ejercicio, se estimula la migración de células polimorfonucleares para eliminar agentes patógenos mediante la producción de O_2.- y H_2O_2 propagando el daño inicial y pudiendo dañar el propio organismo *(10)*.

Tal como se ha dicho a lo largo de su evolución, el organismo humano ha desarrollado mecanismos antioxidantes de defensa, bajo la forma de enzimas y compuestos. Sin embargo, durante la actividad física, aún en individuos entrenados, es previsible una importante producción de radicales libres y, por lo tanto, un mayor requerimiento de mecanismos de resguardo. Algunas defensas antioxidantes se adecuan con el entrenamiento y en presencia de una dieta apropiada, pero pueden ser superada cuando se excede el nivel de ejercicio al cual se han adaptado *(10)(11)(12)*.

Los antioxidantes desempeñan una importante función para la prevención de numerosas patologías. El conocimiento del modo como interactúan los antioxidantes ofrece bases racionales para desarrollar estrategias nutricionales y de intervención farmacológica, que permitan enfrentar tanto el progreso de las afecciones degenerativas del envejecimiento, como las situaciones agudas que se generan por el estrés oxidativo. Para lograr una comprensión efectiva de la protección que brindan, es esencial evaluar todas las sustancias y enzimas antioxidantes y estudiar otras que permitan una mayor protección.

CAPITULO 1

PRESENTACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1.1. ADAPTACIONES MÚSCULOESQUELÉTICO.

Los sistemas de locomoción de las distintas especies han ido evolucionando desde los más rudimentarios y simples, como el de los organismos unicelulares, hasta los más complejos como el de los mamíferos. Dicha diferenciación probablemente comenzó cuando los seres vivos se trasladaron del agua a la tierra, y seguramente fue debida en gran parte a la necesidad de desplazamiento de cada especie para sobrevivir*(1)* Por ello, la mayoría de los mamíferos cuentan con un aparato músculo-esquelético que les permite desplazarse con gran precisión y velocidad para cazar a sus presas o huir de sus depredadores.

Sin embargo, en el caso del ser humano, el sistema de locomoción no está tan preparado para la huida o la caza sino más bien para un desplazamiento más suave caminando, aunque sí permite movimientos de gran precisión manual y desplazarse a cierta velocidad, ya que la diferenciación cerebral ha permitido desarrollar una inteligencia superior al resto de seres vivos, y que supera ampliamente las carencias físicas (fuerza, velocidad, agilidad, etc.) que tiene en comparación con otros muchos animales *(4)*.

Por ello, a pesar de que el entrenamiento de alto nivel ha conseguido enormes logros en el rendimiento deportivo del aparato locomotor tanto en carreras de resistencia (maratón, 2h y 5 min.) como en velocidad (100 m lisos en 9.8 sg), el nivel físico alcanzado por el ser humano es muy inferior al de otros mamíferos.

El desarrollo del cerebro del *homo sapiens sapiens* supuso un hito en el desarrollo del ser humano, cuya defensa de la subsistencia se basó desde ese momento más en el empleo de la inteligencia que de las capacidades físicas. Por ello, desde el punto de vista genético, nuestro sistema músculo esquelético es prácticamente igual que el de nuestros antepasados de la prehistoria *(4)*. Seguramente las diferencias en cuanto a desarrollo de la fuerza etc. estén más relacionadas con los diferentes estímulos ambientales que con la propia dotación genética.

Esto nos hace pensar que el aparato locomotor del hombre no está desarrollado para conseguir altas solicitudes físicas, sino para un desplazamiento menos llamativo. De hecho, el alto rendimiento conlleva frecuentemente lesiones o fatiga por sobreentrenamiento como reflejo de esa exigencia de rendimiento para la que no está preparado.

Pero de igual forma queda claro que el movimiento es parte importante para la supervivencia del hombre, y por ello existe un aparato músculo esquelético suficientemente desarrollado, y relacionado con el desarrollo del resto de sistemas orgánicos. De hecho, las principales patologías del sistema óseo (artrosis y osteoporosis) están ligadas al sedentarismo y a la obesidad que éste suele predisponer. Así, estudios experimentales realizados en conejos a los que se les medía el grosor del cartílago durante el reposo y el ejercicio *(5),* mostraron un aumento del mismo durante el ejercicio debido al aumento del flujo de fluidos desde la zona esponjosa ósea subyacente.

Esto explica en parte la mejora sintomática de los pacientes artrósicos, junto el aumento del líquido sinovial, la menor presión muscular cuando éstos se calientan (disminuyen su viscosidad), etc., cuando se realizan ejercicios suaves. De igual forma, a nivel óseo, el aumento de la masa ósea está directamente relacionado con el estímulo que la tracción tendinosa, debida a la actividad muscular, ejerce sobre el propio hueso. La actividad muscular estimula un efecto osteoblástico especialmente en las zonas óseas relacionadas con la tracción tendinosa, además de mejorar el flujo sanguíneo hacia estos tejidos.

1.2. EL EJERCICIO FÍSICO EN EL MUNDO OCCIDENTAL

Quizás la principal motivación del mundo desarrollado en este tercer milenio sea la mejora de la calidad de vida de su población. En este sentido, y en relación con la práctica del ejercicio físico, la última Declaración del Consenso de la Federación Española de Medicina del Deporte (FEMEDE) en el año 2000**,** *(13)* manifiesta que..." los ciudadanos de la Unión Europea (UE) necesitan con urgencia ampliar su actividad física con el fin de mejorar su nivel actual de salud y sus capacidades funcionales y mantener éstas hasta una edad avanzada". Sin embargo, a pesar de la privilegiada situación de estabilidad política, productividad económica y bienestar social, que en conjunto han llevado a conseguir un alto nivel de salud pública, el estilo de vida derivado de la adquisición de nuevas tecnologías que promueven la tendencia al sedentarismo (maquinaria en fábricas y en el campo, uso de ordenadores, escaleras mecánicas, etc.), ha aumentado las patologías crónicas degenerativas, desencadenadas en gran parte por la disminución de la actividad física en la vida diaria.

Por otro lado, aunque también los sistemas de asistencia sanitaria cuentan con los recursos terapéuticos tecnológicamente más avanzados para abordar la enfermedad en sus distintas manifestaciones, éstos no resultan suficientemente eficaces en la prevención de muchas de las enfermedades con mayor prevalencia en la actualidad en nuestro medio (enfermedad coronaria, hipertensión, obesidad, artrosis, osteoporosis, etc.) De este modo, las estrategias que se establezcan para

conseguir dichos fines tendrán que contar con modelos que incluyan métodos de prevención y promoción de la salud.

Teniendo en cuenta la información creciente sobre los orígenes, causas y factores que elevan el riesgo de padecer muchas de las enfermedades de mayor prevalencia en la actualidad, es necesario aplicar medidas que hayan probado su eficacia y seguridad en la atenuación y prevención de las mismas. Este es el caso de la actividad y el ejercicio físico, sobre los que actualmente se dispone de datos que justifican su promoción generalizada como medida efectiva, segura, práctica y económica para la mejora de la salud y la prevención de enfermedades.

1.3. PATOLOGÍAS DERIVADAS DEL SEDENTARISMO.

Desde la revolución industrial se ha disparado la incidencia de las denominadas enfermedades propias de la civilización, como pago por la mejora de la calidad de vida a costa de disminuir la actividad física. De entre todas ellas la enfermedad coronaria es la de mayor trascendencia por constituir la principal causa de mortalidad en el mundo occidental.

El estudio *Framinghan (7)* mostró, ya en los años setenta, los principales factores de riesgo coronario: hipertensión arterial, hipercolesterolemia, tabaquismo, diabetes, obesidad, personalidad tipo A y además el sedentarismo. De este modo se demostró el efecto directamente perjudicial del sedentarismo sobre la enfermedad coronaria, pero también de forma indirecta dado que la reducción de la actividad física promueve muchos de los demás factores de riesgo.

Hoy en día, son muchos los estudios *(7)(14)* que han corroborado la relación entre los cambios en los hábitos de vida (la obesidad, tabaquismo, estrés, consumo de alcohol, dietas hiperlipídicas e hipersalinas, y la falta sistemática de actividad física) y el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Así, por ejemplo, según el estudio de *Brooks* (*1987*) *(15)*, hasta un 80% de la población de EEUU no mantiene una actividad física regular, y tan sólo el 7% de la población mayor de 18 años realiza una actividad física intensa.

Estos hábitos han conducido a un sensible aumento de la obesidad entre los ciudadanos de ese país, así como al desarrollo de otras muchas enfermedades desencadenadas por ella. Además de otros beneficios, el ejercicio regular puede eliminar el riesgo de enfermedades cardiacas, reducir la presión arterial y ayudar a perder peso *(16)*

Los estudios de *Ingelberg* et al.*(7)* demostraron el efecto positivo de la actividad física sobre el cartílago articular. Dado que el ejercicio también aumenta el líquido intrarticular, que es el medio del que se nutre el cartílago, la inactividad física determina un deterioro de la composición de este tejido. Esto junto el deterioro muscular crean una inestabilidad articular que degrada más rápidamente el cartílago, acelerando los procesos artrósicos.

Al igual que el entrenamiento físico produce una hipertrofia muscular, con aumento de la fuerza y resistencia musculares, y un mayor desarrollo óseo, el sedentarismo y el reposo mantenido conducen a un deterioro cuantitativo y cualitativo del sistema músculo-esquelético. Los estudios realizados en voluntarios sometidos a reposo mantenido en cama, mostraron efectos negativos sobre prácticamente todos los órganos. La pérdida de masa muscular se debe a la pérdida de líquido extracelular (pérdida general del volumen plasmático), y a la de proteínas contráctiles, con un balance de nitrógeno negativo.

Aún así, dicha pérdida no suele reflejarse en reducción del peso total, ya que la disminución del peso magro se compensa normalmente con un aumento del peso graso. De igual forma, el reposo y el sedentarismo provocan una desmineralización ósea, que se traducen en cuadros de osteopenia en los casos más leves (pérdida de masa ósea menor de 2.5 desviaciones estándar de la media), o de osteoporosis, cuando el aumento es superior a 2.5 veces. Esta patología es actualmente una de las más prevalentes en las mujeres menopáusicas, dado el incremento del sedentarismo en este grupo de población, con el aumento del riesgo de sufrir fracturas vertebrales, de cuello del fémur y de radio.

Al igual que sucede con el tejido muscular, el tejido conectivo que forma parte de los tendones también sufre una degradación debida a la falta de estímulo de tracción a causa del sedentarismo. De hecho se ha podido comprobar la disminución de la resistencia de los tendones de animales de experimentación sometidos a reposo en comparación con los más activos *(11)*.

1.4. ADAPTACIONES CARDIOVASCULARES.

Las respuestas nerviosas y neuroendocrinas provocadas por la actividad física determinan un aumento del gasto cardiaco y una disminución de las resistencias vasculares periféricas en el territorio muscular. La repetición de este estímulo provoca a largo plazo adaptaciones tanto miocárdicas como vasculares, que claramente diferencian a las personas físicamente activas de las sedentarias.

El denominado genéricamente como "corazón del deportista" posee modificaciones tanto de la función sistólica como de la diastólica. El ventrículo izquierdo de la población más activa tiene mejoradas ambas funciones debido especialmente a un mejor aporte y recaptación del Ca^{++} a las fibras miocárdicas (unión actomiosina) desde el retículo sarcoplásmico, lo que hace que tanto la distensibilidad como la contractilidad estén aumentadas. Por esta razón el mantenimiento del gasto cardiaco se realiza a expensas de un aumento del volumen latido, mientras la frecuencia cardiaca está reducida en aquellos físicamente activos.

Por otro lado, el hecho de que la población más activa tenga una menor incidencia de hipertensión arterial que la más sedentaria *(16),* refleja el mejor funcionamiento del sistema circulatorio como adaptación al ejercicio. Una de las adaptaciones más relacionada con la del sistema circulatorio, es la del sistema nervioso autónomo. El ejercicio provoca un incremento lineal de la secreción de catecolaminas, hasta una intensidad que corresponde al umbral anaeróbico, a partir de la cual dicho incremento es exponencial.

El estímulo mantenido repetidamente a una intensidad inferior a la del umbral determina una adaptación del sistema nervioso simpático, que aumenta la sensibilidad de los receptores β- adrenérgicos de tal forma que su activación precisa de un menor estímulo catecolaminérgico, y por lo tanto una menor secreción de catecolamina. De este modo, dicha adaptación al ejercicio mantenido determina una menor secreción catecolamínica para una misma intensidad de esfuerzo. Dicha reducción es importante frente al riesgo cardiovascular relacionado con la sobrestimulación catecolamínica que determinan un mayor riesgo de sufrir arritmias malignas, que pueden desencadenar episodios de muerte súbita.

1.5. EJERCICIO FÍSICO Y FACTORES DE RIESGO CORONARIO.

Hasta finales del siglo XIX y primeras décadas del XX, la principal causa de mortalidad de la población eran las enfermedades infecciosas. Pero, el descubrimiento de los antibióticos y el cambio en los hábitos de vida relacionados con el desarrollo industrial y tecnológico, han hecho que en la actualidad la mortalidad por enfermedades cardiovasculares sea el principal problema de salud en el mundo occidental.

Al estudiar los efectos del reposo prolongado se ha observado que uno de los efectos más llamativos es la modificación del sistema cardiocirculatorio *(9).* Estas modificaciones incluyen el deterioro de la función miocárdica (especialmente la diastólica) y del control del automatismo del árbol circulatorio. La reducción del

consumo máximo de O_2 que se observa en estas circunstancias juega un papel muy importante por su trascendencia en el deterioro funcional de ostros órganos y sistemas.

Dicha reducción, que puede variar entre un 1% hasta un 26%, dependiendo del tiempo de reposo, está relacionada con la disminución del volumen latido (por reversión de la hipertrofia miocárdica fisiológica) y del gasto cardiaco, en estas circunstancias en las que el retorno venoso también está reducido. La reducción del VO_2max. también se relaciona con la menor capacidad oxidativa de los tejidos, especialmente de las fibras musculares, según se desprende del menor número de mitocondrias y de la menor actividad enzimática oxidativa.

Desde el estudio *Framingham (7)* a finales de los años 60, se conocen los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Uno de dichos factores es el sedentarismo, y de hecho gran parte de los restantes factores de riesgo también están relacionados con el sedentarismo. Tan importante ha llegado a ser este hábito que el último eslogan en el Día Mundial de la Salud, promovido por la OMS, ha sido "*Por tu salud, muévete*". Esta organización ha calificado al sedentarismo de nuestros días como una verdadera epidemia no transmisible.

Así la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes tipo II, y la obesidad tienen una mayor prevalencia en las poblaciones más sedentarias. En los trabajos de *Wood, J et al (17)* se observa una menor incidencia de hipertensión y de diabetes tipo II en las poblaciones físicamente activas, concluyendo estos trabajos que la actividad física es no sólo un elemento importante en el tratamiento de estas dos patologías, sino también como prevención de las mismas.

Al igual que el ejercicio físico regular produce efectos beneficiosos sobre el miocardio y el sistema vascular hipertrofia fisiológica miocárdica, con mejora de la distensibilidad y de la contractilidad, aumento de la producción de vasos capilares a nivel muscular, etc. El sedentarismo provoca un deterioro de la funcionalidad del sistema cardiovascular, con efectos deletéreos.

El deterioro del miocardio es menos llamativo que el del sistema muscular esquelético. Esto ha sido atribuido a la mayor protección miocárdica frente al estrés oxidativo y a la utilización de sustratos como el ácido láctico como fuentes energéticas importantes a este nivel. Pero, recordemos que el miocardio es el

único músculo que permanece en contracción activa desde el nacimiento hasta la muerte.

De hecho, dicha regularidad en su actividad pudiera ser un importante estímulo para el mantenimiento de una mayor protección frente a dicho daño oxidativo, ya que, aunque el sujeto no esté físicamente activo, su miocardio sí lo está permanentemente consiguiendo mantener unas adaptaciones suficientes para combatir los efectos perjudiciales del sedentarismo. Así el principal riesgo que tiene el miocardio sano puede residir en las respuestas de otros sistemas, como el neurohormonal, frente al deterioro ligado al sedentarismo. El caso más evidente es el de la insuficiencia cardiaca. El paciente con insuficiencia cardiaca es el paradigma del sedentarismo. De hecho hasta hace tan solo unas décadas, el ejercicio físico estaba contraindicado y proscrito en estos pacientes.

En el paciente con insuficiencia cardiaca, la patología miocárdica primaria, determina la puesta en acción de medidas contra reguladoras que tratan de compensar la disminución del gasto cardiaco. Pero, las respuestas compensadoras, inicialmente beneficiosas, acaban por cerrar un auténtico círculo vicioso. Estos pacientes suelen ser mayoritariamente sedentarios, viéndose estimulado dicho hábito por el miedo del propio paciente y de su entorno al ejercicio y a los riesgos que éste pudiera desencadenar. Recordemos que la insuficiencia cardiaca se presenta principalmente en enfermos con edades superiores a 65 años, con un escaso desarrollo muscular, sobrepeso, y patologías, como la artrosis, asociadas al envejecimiento que dificultan aún más la capacidad funcional de estos pacientes.

Han sido muchos los estudios que han demostrado la relación existente entre la práctica regular de ejercicio y la disminución de los niveles de presión arterial, tal como queda demostrado en la baja incidencia de pacientes hipertensos entre los sujetos activos, así como en deportistas cuya condición física fue conseguida mediante el entrenamiento regular *(18)(19)* En este mismo sentido, en los años 70 en un estudio realizado en más de 3.000 varones, se observó que las presiones sistólicas y diastólicas en reposo de las personas con buena preparación física eran significativamente inferiores a las registradas en individuos con una forma física deficiente *(20)*

Así mismo, otro estudio comprobó una disminución significativa de las presiones sistólicas y diastólicas en reposo de 66 varones de mediana edad después de un año de entrenamiento aeróbico moderado *(21)* Se efectuaron observaciones similares, aunque de menor magnitud, en varones no entrenados, de

edades comprendidas entre 52 y 88 años, al cabo de sólo 6 semanas de entrenamiento aeróbico *(22)*

Estudios realizados en el *Joslin Diabetes Centre, de Boston* (EEUU) *(1997) (14),* han demostrado que el ejercicio físico produce efectos semejantes a los de la insulina en la estimulación de la absorción de la glucosa por parte del músculo esquelético. Agregando además que el ejercicio físico puede constituir una parte importante del programa de tratamiento para la mayoría de los individuos afectados de diabetes de tipo l o de tipo 2. Pero además de ello, también la actividad física regular se ha demostrado que reduce el riesgo de desarrollar la diabetes mellitus no insulino dependiente, siendo cada vez mayor el número de estudios dirigidos a profundizar en los mecanismos que subyacen a este efecto *(23)(24)*

De este modo, se ha podido establecer que el efecto de la actividad física en la reducción del riesgo de padecer diabetes mellitus es superior en las personas con volúmenes mayores de ejercicio. La obtención de este efecto necesita intensidades que oscilen entre el 20 y el 60.5 %**.** Las actividades moderadas, sobre todo de fortalecimiento, aunque también de resistencia son eficaces *(25)*

Según los datos recogidos por el *National Institute of diabetes, Digestive and Kidney Diseases (1999) (26)* la obesidad representa uno de los problemas de salud más graves y difundidos, no sólo en Estados Unidos donde 97 millones de adultos, o sea el 55% de la población tiene sobrepeso, sino también en la mayor parte de los países industrializados del mundo.

De hecho en el marco de la celebración Vlll Congreso Internacional sobre Obesidad en París *(1998)* se dejó en evidencia que Italia, Francia, y España observan un 30% de obesidad y que, Alemania y Gran Bretaña tienen en cambio un porcentaje de un 55%. El *National Institute of Health (1998)* en colaboración con el *National Heart, Lung and Blood Institute*, ha publicado un texto acreditado con indicaciones clínicas sobre la obesidad, donde se sitúa al ejercicio físico como componente clave para detener la obesidad y las condiciones que de ellas se derivan *(27)*, ya que el sobrepeso es un factor de riesgo muy importante y causa de muchas enfermedades comunes como la cardiopatía coronaria, el accidente cerebro vascular, la diabetes, la artrosis, el dolor lumbar y algunos cánceres, además de numerosos problemas psicológicos y sociales *(28).*

Los estudios demuestran de manera convincente que, sin una actividad física regular, el control del peso suele resultar imposible de lograr *(27)* De hecho, en un estudio realizado en una población finlandesa, el riesgo de ganancia de peso

clínicamente significativo en el transcurso de diez años en el grupo de personas sedentarias era de 2 a 2.5 veces superior al de los sujetos que realizaban una actividad física regular *(29)* El grado de actividad necesario, por ejemplo, para mantener el peso después de haberlo perdido es considerable, en torno a los 80 minutos diarios de ejercicio moderado o a los 35 minutos al día de práctica regular en el caso de un estilo de vida sedentario *(27)*

Pero, además de las patologías cardiovasculares, existe otras cuya incidencia ha aumentado sensiblemente en el último siglo, coincidiendo con la disminución de la actividad física como hábito general de salud. De entre ellas, la osteoporosis, la artrosis, el cáncer y algunos trastornos psíquicos, como la depresión, son algunas de las patologías que responden a este incremento actual.

Hoy en día, en trabajos más recientes se reconoce que, el uso del ejercicio terapia ha adquirido gran relevancia en el tratamiento de un sin número de enfermedades crónicas ligadas al sedentarismo, tanto en su aplicación a pacientes como su posible introducción como coadyuvante en la drogo terapia en estadios más avanzados de la enfermedad. *(30)(31)*

Esto concuerda con los resultados obtenidos hace algunos años en el *Cooper Institute for Aerobics Research,* con sede en Dallas-Texas (EEUU), donde se obtuvieron resultado extremadamente significativos en el campo de la investigación sobre temas como la epidemiología, aspectos fisiológicos de la actividad física, cáncer, obesidad, alimentación, diabetes, artritis y enfermedades cardiovasculares *(28)*

En los últimos treinta años se han desarrollado muchas investigaciones médico-deportivas, que han confirmado que la actividad física contribuye a la mejora de la calidad de vida y a la disminución del riesgo de ciertas patologías. Uno de estos trabajos informado por el *Harvard Centre for Cancer Prevention (1999)(32),* demuestra que caminar a un buen ritmo, al aire libre o sobre el tapiz rodante durante 30 minutos al día es suficiente para reducir considerablemente el riesgo de cáncer de colon, que es la segunda causa de mortalidad por cáncer en los Estados Unidos.

A través del análisis de los datos, los autores concluyen que si la población aumentase su nivel de actividad física, el resultado sería una reducción del cáncer de colon en un 15%. La traducción de este porcentaje a cifras, supone casi 15.000 casos menos de cáncer de colon, que cada año acaba con la vida de 55.000 personas.

Otras cuarenta y cinco investigaciones informadas por la *Surgeon General's Report (1996)(33),* relacionadas con esta patología han puesto en evidencia que los beneficios de la actividad física preventiva se manifiestan, en la misma medida, en la población masculina que en la femenina. Otro estudio realizado sobre otras localizaciones del cáncer, corrobora los datos relativos al efecto de la actividad física también en la reducción del riesgo de cáncer de mama *(33)*

Los datos epidemiológicos indican que el efecto protector de la práctica del ejercicio es generado fundamentalmente por las actividades de fortalecimiento, pero resultaría algo prematuro formular recomendaciones específicas sobre actividad física para la prevención del cáncer *(32)*

1.6. BENEFICIOS Y RIESGOS DEL EJERCICIO FÍSICO.

En los años cincuenta se comenzaron los primeros trabajos con el fin de relacionar la practica del ejercicio con la mejoría de la morbimortalidad cardiovascular. Una de las primeras demostraciones de que el ejercicio físico protege contra las afecciones coronarias se encuentra en el estudio de *Morris J. (1953) (34)* sobre una muestra de casi 31.000 empleados, todos ellos varones, entre 35 y 64 años de edad de la red de autobuses londinense, el que comparaba la morbimortalidad de los cobradores que realizaban un gasto energético subiendo y bajando regularmente desde la plataforma alta de los autobuses durante toda su jornada laboral, con la de los conductores que permanecían sentados frente al volante durante todo el día.

Las conclusiones de este estudio muestran que los cobradores tenían menor incidencia de cardiopatía coronaria, que éstas aparecían más tardíamente y que eran de menor gravedad, ocasionando una menor mortalidad con relación al grupo de los conductores.

Pero no fue sino hasta mediados de los años ochenta cuando el grupo de epidemiólogos encabezado por *Paffenbarger (1986) (6)* demostró la relación entre la actividad física y la reducción del riego de muerte por cualquier causa, con el ya clásico estudio realizado con ex alumnos de la Universidad de Harvard. Los resultados más llamativos de este estudio sobre la relación entre actividad física y el aumento de la expectativa de vida fueron los siguientes:

- Los grupos de población más activos estaban más protegidos frente a las enfermedades cardiovasculares que los más sedentarios.

- Cuando el gasto calórico de la actividad física realizada semanalmente era de 2.000 Kcal. , como por ejemplo al caminar una hora al día a 6 km/h, el riesgo de morir por cualquier causa se reducía hasta en casi un 40%.

- El ejercicio realizado en el pasado no protegía a quienes no continuaban practicándolo, sino sólo a aquellos que se mantenían físicamente activos. De ello se puede deducir que cualquier edad es buena para comenzar a hacer ejercicio y obtener beneficios.

Por otro lado, en el año 1995 eran aproximadamente 100 millones los americanos aquejados de enfermedades crónicas. Se espera que éste numero subirá presumiblemente a 134 millones en el año 2020 y a 167 millones en el año 2050, según el *Institute for Health and Aging* de la Universidad de California y *la Robert Wood Johnson Foundation* en una investigación publicada por el *Journal of the American Medical Association (1996) (35).* Agregando además que el gasto por esas enfermedades ascendía en el año 1990 a 425 billones de dólares pudiendo llegar en el año 2025 a 906 billones.

No obstante, un trabajo realizado en el *Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School (1997) (17)* sobre un grupo de 2014 hombres noruegos, de edad comprendida entre los 40 y los 60 años, iniciado a comienzos de los años 70 y continuado hasta mediados de los años 90, ha demostrado que también pequeñas mejoras de las condiciones físicas de un individuo llevan a una vida más larga. De nuevo la conclusión era que nunca es demasiado tarde para comenzar la actividad física, y que aunque lo mejor sería que se realizara durante toda la vida, comenzar un programa de entrenamiento a edad avanzada produce también mejoras de la salud

En un estudio publicado por el *British Journal of Medicine (1997) (36)* se observaron los efectos benéficos obtenidos a nivel cardiaco por un programa de caminata de 18 semanas aplicadas a un grupo de adultos sedentarios. El resultado más alentador de la investigación ha sido la mejora de la salud de los sujetos en un tiempo limitado, mediante un ejercicio de intensidad moderada, lo que determinó una mejora de sus parámetros cardiorrespiratorios y de su capacidad aeróbica.

En un estudio publicado por el *Journal of the American Medical Association (1997) (37),* las mujeres en edad post-menopáusica (n=40.500) que practican un ejercicio moderado muestran menor riesgo de muerte prematura respecto a las mujeres que no practican actividad física alguna. El estudio subraya que el incremento de la frecuencia y de la intensidad del ejercicio conlleva a veces una sensible disminución del porcentaje de muerte precoz.

En otro estudio llevado a cabo por la *Columbia School of Public Health*, publicado en el *American Journal of Public Health (1998) (38),* ha sido desmentido el tópico que afirma que las mujeres embarazadas con intensa actividad física corren mayor riesgo de parto prematuro. El estudio ha sido realizado sobre un grupo de 557 mujeres embarazadas pertenecientes a la clase media. Han sido subdivididas en grupos homogéneos, según el tipo de actividad realizada: ningún ejercicio; ejercicio moderado; ejercicio intenso. La investigación ha demostrado que no había mucha diferencia en el momento del parto entre las mujeres activas y las poco entrenadas; por el contrario, se ha constatado en mujeres más entrenadas, una disminución en vez de un aumento, del riesgo de nacimientos prematuros. Constatándose además que estas mujeres han parido más rápidamente que las otras.

También en los pacientes con cardiopatía coronaria el entrenamiento aeróbico produce muchas de las adaptaciones cardiovasculares que ocurren en las personas sanas *(39)(40)* La frecuencia cardiaca, en reposo y con una carga de trabajo sub-máxima, se reduce en los pacientes con cardiopatía coronaria después de un período de entrenamiento aeróbico *(41)*, de igual forma que se ha observado una mejora de manera uniforme del consumo máximo de oxígeno en estos pacientes *(42)(43),* evidenciándose después del entrenamiento aeróbico, que el VO_2 máx. se incrementaba en un 18% en los pacientes con cardiopatía coronaria sin angina y un 30% en los pacientes con angina *(44)(45)* Incluso los pacientes con míocardiopatía isquémica, y depresión severa de la fracción de eyección ventricular izquierda pueden exhibir una tolerancia normal al ejercicio *(46)(47)(48)(49)*

En otro estudio los pacientes con disfunción ventricular izquierda y fracciones de eyección del 30% o inferiores, practicaron ejercicio sobre el tapiz rodante. El 50% mostró una tolerancia normal al ejercicio a pesar de una significativa disfunción ventricular izquierda, y algunos exhibieron una capacidad de ejercicio importante, considerando su grado de disfunción *(50)*

En el informe *Physical Activity and Health (2000)* afirma que la actividad física regular y la aptitud cardiorrespiratoria reducen el riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular en general y por cardiopatía coronaria en particular, regulando además, previniendo o retrasando el desarrollo de la hipertensión arterial y mejorando la situación de las personas que ya la padecen.

Existen muchos datos *(51)(52)(40)* convincentes sobre los efectos de la actividad física en la reducción del riesgo de desarrollo de cardiopatías coronarias,

de sus manifestaciones clínicas y de la mortalidad que provocan. También se observa una evolución similar en cuanto a la relación entre la actividad física y el riesgo de accidente cerebro vascular *(53)(54)*

1.7. OTROS EFECTOS DEL EJERCICIO FÍSICO.

Ya que los beneficios de un entrenamiento de sobrecarga aeróbico mejora de manera significativa una variedad de capacidades funcionales relacionadas con el transporte y utilización de oxígeno *(55)* Las mitocondrias del músculo esquelético entrenado tienen una capacidad mucho mayor para generar el ATP aeróbicamente mediante la fosforilación oxidativa *(56)* Igualmente, se observa un aumento tanto del número como del tamaño de las mitocondrias y una potencial duplicación del nivel de las enzimas del sistema aeróbico *(57)*. Además, el contenido de mioglobina de los músculos esqueléticos en animales aumenta en 80% *(58)*, y se observa un aumento en la capacidad de músculo entrenado para movilizar y oxidar las grasas *(59)* como también de oxidar los carbohidratos *(60)* determinando además, adaptaciones metabólicas en los diferentes tipos de fibras musculares *(61),* y una hipertrofia selectiva de diferentes fibras musculares a causa de un entrenamiento específico de sobrecarga *(62)*

Sin embargo, esta respuesta adaptativa e intermediaria al esfuerzo va a depender del tipo de ejercicio, de su intensidad de su duración y frecuencia, como también estará condicionada por la función del miocardio, el estado de vascularización periférica la edad de los sujetos, al sexo y, por sobre todo, a su nivel de entrenamiento *(63)* Aunque existen diferencias por edad y género como respuesta a la actividad física los datos acumulados indican que la mayoría de los efectos pueden observarse en los dos sexos y en una amplia gama de edades *(64)*

La intensidad, la duración, como la frecuencia del ejercicio es importante a la hora de dosificar el entrenamiento *(65),* está demostrado que combinando adecuadamente estas variables pueden conseguirse mejoras cardiorrespiratorias por medio de un programa físico realizado a intensidades de entre el 50% y el 85% del VO_2 máx. con una frecuencia de dos a cinco veces por semana y una duración de 15 a 60 minutos *(66)* Actualmente, los estudios demuestran que las actividades de intensidad moderada generan beneficios considerables para la salud.

El *American College of Sports Medicine (2000) (67)* define desde el punto de vista fisiológico que, dichas actividades deben conllevar un gasto de energía entre 3 y 6 MET o 4 y 7 kcal/min. La recomendación actual de una actividad física para la salud definida por otros organismos especializados de los Estados

Unidos como, *CDCP & ACSP (1993*) *U.S, Surgeon General (1996)* consiste en la acumulación de 30 minutos o más de actividad física de intensidad moderada. Asimismo, se ha propuesto una definición semejante en el Reino Unido *(68)* Esta breve recomendación constituye un mensaje de salud para las personas sedentarias, y se basa en gran medida en la tradición y la prioridad concedida a los beneficios cardiovasculares de la actividad física.

Uno de estos beneficios es el incremento de la capacidad máxima de trabajo, expresado por lo habitual como consumo máximo de oxígeno *(69),* que se produce en función del incremento del gasto cardíaco máximo y del aumento de la diferencia arteriovenosa en la concentración de oxígeno *(70)* A parte de los numerosos beneficios que se logran con el ejercicio, también se siguen otras consecuencias de compleja significación, como la facilitación de la función inmune y la mayor resistencia de los deportistas a las infecciones *(71)*

1.8. RIESGOS POTENCIALES DEL EJERCICIO FÍSICO

En cualquier caso, si el programa de entrenamiento no está correctamente orientado según las diferencias individuales y las variables de sobrecarga aeróbica, podría provocar una carga excesiva que aumentara el riesgo de padecer manifestaciones adversas, tanto desde el punto de vista patofisiológico como psicosomático, comprometiendo la salud del deportista *(72)* Existe una mínima diferencia entre entrenar lo justo para conseguir una excelente preparación acompañada de un buen estado de salud, y realizar una preparación excesiva, que pueda provocar lesiones y desencadenar respuestas en distintos órganos que pudieran situar al sujeto en un mayor riesgo de fatiga crónica y de entrar en un síndrome de sobreentrenamiento *(73)*

En el informe *Physical Activity and Health (2000),* se comunica que el efecto adverso más común de la actividad física competitiva y no competitiva en la población consiste en el padecimiento de lesiones agudas por repetición y de accidentes cardiovasculares, en especial el infarto agudo al miocardio y la muerte súbita *(48)(49)* El peligro aumenta al elevar la intensidad de la actividad y es mucho mayor en personas que no están acostumbradas al ejercicio que en las ya habituadas *(52)(57)(66)*

Ya que los esfuerzos físicos cuyas intensidades superan la del umbral anaeróbico, provocan respuestas orgánicas que aumentan los riesgos de sufrir un accidente traumatológico e incluso coronario, al desencadenar entre otros, una sobrestimulación simpática, un incremento del daño oxidativo y una disfunción inmune, relacionados con el incremento de la producción de radicales libres *(74)(75)*

Varios estudios en los últimos años han demostrado alteraciones inmunológicas provocadas por el sobreesfuerzo *(76)(77)(78)* Estos efectos se han observado especialmente tras realizar ejercicios de contracciones musculares excéntricas, que provocan mayor daño *(79)(80),* reflejado en el incremento en la circulación de las enzimas mío celulares, lesión de la ultra estructura de sus células y desarrollo de una marcada respuesta inflamatoria *(81)*

De este modo los ejercicios de alta intensidad provocan un verdadero estado inflamatorio, con aumento de producción por los neutrófilos e incluso por los miocardiocitos de citoquinas proinflamatorias (IL-1,IL-6 y TNF) *(74)(78)(80)* Dicha respuesta, junto con el aumento de catecolaminas y de cortisol, provoca daño catabólicos musculares e incluso miocárdicos, que aumentan el riesgo de sufrir accidentes coronarios.

El aumento en la producción de TNF alfa, junto con el aumento del estrés oxidativa y otros factores, tienen un efecto cardiodepresor, e incluso potenciador de los fenómenos de apoptosis en las células miocárdicas *(82)*

La depresión del sistema inmune junto con el incremento del estrés oxidativo forman parte del síndrome de sobreentrenamiento, existiendo una relación directa con la patogenia de las lesiones musculares y un estado de inflamación sistémica *(83)* Así, al desencadenar en su inicio alteraciones hormonales, metabólicas y neuropsicológicas *(84)* reflejadas en una disminución de la capacidad de resistencia y de rendimiento, la alteración del sistema inmune queda establecida como uno de los factores más claramente implicados en los mecanismos de la fatiga muscular *(85)*

Aunque sean ampliamente conocidos los beneficios que se derivan del ejercicio físico, también existe considerable evidencia de que, durante ejercicios extenuantes la adaptación de los mecanismos antioxidantes pueden ser superados *(86),* aumentando la producción de radicales libres (RL) que producen daño oxidativo en el tejido muscular, hígado, sangre y posiblemente en otras estructuras *(87)(88)(89)*

A pesar de que la formación de radicales libres de oxígeno por las células fagocíticas constituye un importante mecanismo de defensa frente a la infección microbiana y en la fase efectora de la respuesta inmune, también puede ejercer efectos nocivos sobre las distintas estirpes celulares atendiendo a su concentración, localización y presencia de sistemas de control *(90)*

En condiciones normales, los radicales libres se forman de manera limitada durante el metabolismo celular en varios sistemas: cadena de transporte de electrones mitocondrial, en el retículo endoplásmico, durante la síntesis de

prostaglandinas y sistemas de la lipooxigenasas, de proteínas y de enzimas, y también por autooxidación de numerosos compuestos *(91)* Pero, si se producen en exceso y se liberan al medio extracelular o existe un defecto en su neutralización dan lugar a numerosos efectos nocivos al dañar todos los tipos de moléculas orgánicas *(92)*

Durante el ejercicio existen diversas fuentes de producción de RL. Una de ellas se debería al escape de electrones, probablemente a nivel de la ubiquinona-citocromo b, en la cadena mitocondrial de transporte de electrones con producción de anión superóxido (O_2-.) *(93)(94)* Ya que durante el ejercicio el consumo total de oxígeno aumenta entre diez y veinte veces *(95),* y a nivel del músculo el flujo es aún diez veces mayor *(96),* es razonable suponer, que la producción de O_2-. se halla igualmente incrementada *(88)*

Otro mecanismo posible es el de isquemia-reperfusión, durante el ejercicio. El flujo sanguíneo está comprometido en diferentes órganos y tejidos al redistribuir el flujo hacia los músculos activos, con lo que dicha restricción provoca situaciones de hipoxia, que es tanto mayor cuanto más intenso es el ejercicio, y más aún si se supera la capacidad aeróbica máxima *(97)* Incluso el propio músculo activo puede entrar en un estado de hipoxia por insuficiente aporte energético *(98)*

Sin embargo, al finalizar la actividad intensa, todas las áreas afectadas son reoxigenadas, cumpliendo el fenómeno de isquemia reperfusión con la conocida producción de RL que la acompaña *(99)(100)* Un tercer posible mecanismo de generación de RL es la autooxidación de catecolaminas, cuyos niveles suelen estar aumentados durante el esfuerzo *(101)*

Además de todo ello, el O_2-. producido por los mecanismos mencionados, puede reaccionar con otra molécula similar en presencia de protones, para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que al reaccionar con metales de transición produce radical hidroxilo (HO.) *(102)* Este radical es una de las especies más tóxicas y reactiva del oxígeno, que reacciona rápidamente con cualquier otra molécula, pudiendo dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleico *(103)*

Por lo tanto, con el ejercicio físico no controlado, el organismo puede llegar a un frágil equilibrio entre la mejora del rendimiento deportivo y la aparición de ciertas patologías tales como el síndrome de sobreentrenamiento y el de fatiga crónica, caracterizados por fatiga severa, febrícula, mialgias generalizadas y alteraciones del sueño, afectivo y neurocognitivas *(104)*

Las alteraciones tisulares inducidas por el ejercicio, a nivel del músculo esquelético, por la sobreproducción de radicales libres y disfunción del sistema inmune, también se producen al parecer, en el hígado y corazón. En el hígado la isquemia-reperfusión, desarrolla una serie de fenómenos fisiopatológicos complejos, en los que se implican todos los componentes celulares del parénquima hepático, así como del endotelio vascular *(105)*

Durante la isquemia, la hipoxia y otras situaciones de déficit energético, algunas proteasas citosólicas se activan por el aumento del calcio intracelular *(106),* activándose diferentes sistemas enzimáticos que, con la reoxigenación del órgano, producen a su vez una activación de los mediadores de la inflamación *(107)* En el hígado, la catalización de la conversión de la enzima xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa determina una catabolización de las purinas en muchos tejidos, provocando la oxidación de hipoxantina a xantina y ácido úrico, con la generación del radical superóxido *(108).*

Los radicales libres formados, durante el período de reperfusión, atacan los enlaces insaturados de los ácidos grasos libres en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular *(109)* La lipoperoxidación, se propaga en cadena y provoca la fragmentación de la membrana celular y, con ello, severas alteraciones estructurales y funcionales, finalizando en un daño celular irreversible *(110)* apareciendo como consecuencia de estos fenómenos, una alteración en la función hepática *(111)*

Cabe entonces preguntarse si, ya que durante el ejercicio se produce una redistribución sanguínea disminuida a los tejidos caracterizada por una hipoxia temporal y con una reoxigenación al termino de la actividad física intensa, existiese algún suplemento dietético funcional que previniera las alteraciones celulares propias del fenómeno de isquemia-reperfusión con la conocida producción de radicales libres que la acompaña.

También, se ha propuesto que el estrés diastólico de sobrecarga hemodinámica y mecánica del corazón, provocan un incremento de la apoptosis cardiomiocitaria, ya que la sobreexpresión de la proteína "Fas" depende del grado de sobrecarga impuesta sobre el miocardio. Así mismo, la sobrecarga hemodinámica del miocardio está caracterizada por un incremento en el consumo de oxígeno generando especies reactivas del oxígeno (O_2.-), como también de citoquinas proinflamatorias, como el TNF alfa cuya expresión puede ser inducida en el propio cardiomiocito por macrófagos o mediante la acción de otras citoquinas, desconociéndose el mecanismo molecular por el cual el TNF alfa causa apoptosis en estas células (112).

De todo lo anterior podríamos concluir que los radicales libres de oxígeno, H_2O_2, ON.- y O_2.- que se producen por el ejercicio son altamente reactivos y descontrolados que resultan del entrecruzamiento de las cadenas del ADN, proteínas y lípidos en la misma molécula o entre molécula *(113)* También pueden provocar daño oxidativo en importantes grupos funcionales de las biomoléculas, acelerando el envejecimiento y las enfermedades que la acompañan *(114)*

Si bien este planteamiento es cierto, también contamos con unos sistemas antioxidantes enzimáticos específicos que tratan de evitar la difusión de los radicales fuera del compartimiento en que fueron creados, como es el: Superóxido Dismutasa, (SOD), Catalasa y el Glutation Peroxidasa (GSH-PX) *(115),* y un sistema no enzimático como la vitamina E (VE), el ubiquinol o coenzima Q y varios carotenoides derivados de la cadena alimenticia. Varios de ellos, incluyendo la VE, el ascorbato o vitamina C (VC), tioles y ubiquinonas, se basan en principios de reacciones redox. Los caratenoides y flavonoides son también poderosos antioxidantes *(116)*

Sin embargo, algunas de las defensas antioxidantes se adecuan con el entrenamiento en presencia de una dieta adecuada, no obstante, estas pueden ser superadas cuando se excede el nivel de ejercicio al cual se han adaptado *(117)*

Desde el punto de vista inmunológico, el ejercicio habitual pero moderado conlleva diversos beneficios fisiológicos, comportándose como un eficaz mecanismo de inmunomodulación pues facilita la función inmune y aumenta la resistencia a las infecciones *(118)*

Sin embargo, la realización de ejercicios extenuantes está relacionada con la patógena de las lesiones musculares y en el estado sistémico de la inflamación *(119)* Una situación de estrés oxidativo que merece especial atención es la práctica deportiva tanto recreacional como profesional. Durante la misma, del 5 al 10% de O_2 que respiran las mitocondrias, no se oxidan completamente a H_2O sino que lo hacen monovalentemente a O_2-.

Esta molécula es tan reactiva como impredecible la diana sobre la que actúa, lo que hace que la generación continuada de la misma, reduzca la propia capacidad mitocondria de obtener energía (depleción de la coenzima Q_{10}) y el estado redox de la célula (depleción de glutation reducido o alfatocoferol) Ambos procesos son responsables a corto y medio plazo de procesos inflamatorios y de numerosas lesiones y sobrecarga muscular, mientras que a largo plazo acelera los procesos de envejecimiento muscular por un incremento paulatino de mutaciones y deleciones del propio ADN mitocondrial *(120)* A su vez las alteraciones tisulares pueden perpetuar y ampliar la disfunción del sistema inmune que estaría

inicialmente desencadenada por variaciones hormonales, metabólicas y neuropsicológicas *(119)*

Son muchos los factores que pueden modificar la función del sistema inmune y los procesos oxidativos, como son los microbiológicos, la edad, los ambientales, los metabólicos, los genéticos, los hábitos de vida, etc. y los nutricionales *(121)* Los tratamientos clásicos del síndrome caquéctico pasan por el uso de dietas especiales, suplementos dietéticos, testosterona, nandrolona e, incluso, hormona de crecimiento, aunque ninguno de estos tratamientos da resultado satisfactorios.

La relación entre nutrición, caquexia y sistema inmune es de sumo interés al haberse establecido en los últimos años que existen niveles anormalmente elevados de TNF y, probablemente de otras citoquinas pro-inflamatorias, en enfermos de SIDA *(122)(123)*, cáncer *(124)* e insuficiencia cardiaca *(125)* con síndrome caquéctico.

1.9. EFECTO INMUNOMODULADOR DEL *PHLEBODIUM DECUMANUM.*

De entre los suplementos nutricionales funcionales susceptibles de mantener el estatus redox celular, tras la sobrecarga repetitiva de ejercicio físico, cabe destacar el extracto de *Phlebodium decumanum* (PD) Permitiendo al parecer mantener altos los niveles plasmáticos del antioxidante endógeno por excelencia, el alfa-tocoferol, también lo hace de uno de los componentes claves en el sistema de transporte de electrones mitocondrial, el CoQ_{10}. Estos efectos deben suponer una mayor funcionalidad mitocondrial y sobre todo la prevención de alteraciones celulares propias de los síndromes por estrés oxidativo *(120)*

El uso de PD en la reversión del síndrome de sobreesfuerzo físico y de los efectos negativos del mismo ha demostrado que los deportistas que lo utilizan mantienen un elevado y constante nivel de esfuerzo sin la aparición de los efectos no deseables asociados a la fatiga *(126)*

Las formulaciones de *Phlebodium decumanum* podrían actuar no sólo como mero aporte nutricional sino también regulando los niveles de TNF, según se desprende de los estudios llevados a cabo en el *Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" del CSIC en Madrid,* donde se ha demostrado la acción reguladora del *Phlebodium decumanum* sobre la liberación de TNF en modelos experimentales in vitro *(126)*

En lo relativo al síndrome de sobreesfuerzo físico y sobre-entrenamiento, se admite igualmente la existencia de una disfunción inmune caracterizada, entre otros factores, por la liberación de elevadas cantidades de TNF *(127)* Su importancia se basa en que a la fecha las numerosas investigaciones con relación al tema de suplementación de antioxidantes exógenos, ya que, puestos en dosis biológicas no adecuadas no producen efectos beneficiosos ya que, en la mayoría de los casos se recurren a cantidades farmacológicas que con suma facilidad pasan a producir efectos prooxidantes y por tanto acentúan aun más las alteraciones que se pretenden prevenir o corregir *(120)*

Por lo que nos preguntamos si, la ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum* administrada en la alimentación habitual en animales de experimentación y, sometidos a un programa de entrenamiento físico crónico y extenuante ¿regulará la función inmune mediante el control de los niveles de TNF alfa y, protegerá de las especies reactivas del oxígeno como, una vía no dopante en la prevención y la reversión del síndrome de sobreesfuerzo y fatiga crónica?

En la plena convicción de lo antes mencionado se pasa a definir los objetivos y la hipótesis de trabajo del presente estudio de investigación:

1.10. OBJETIVOS:

Estudiar el efecto protector e inmunomodulador del *Phlebodium decumanum (PD)* sobre los procesos fisiopatológicos que desencadenan y mantienen el síndrome de sobreesfuerzo y fatiga crónica en animales de experimentación.

- Estudiar los efectos del ejercicio extenuante sobre el miocardio, músculo e hígado, a través del grado de peroxidación lipídica y funcionalidad mitocondrial.

- Estudiar la disfunción del sistema inmune desencadenada por el síndrome del sobreesfuerzo.

1.11. HIPÓTESIS EXPERIMENTALES

- H1 Los animales alimentados con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum (PD)* y sometidos a esfuerzo físicos extenuantes, observan menos daños tisulares por especies reactivas del oxígeno, en comparación a los que hacen ejercicio intenso y no consumen PD.

- H2 Los animales sometidos a esfuerzos físicos supramaximales y sin ingesta suplementaria de PD observan como respuesta una disfunción del sistema

inmune con una mayor presencia de citoquinas pro-inflamatorias, interleuquinas (IL-1, IL6) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF alfa)

1.12. HIPÓTESIS NULAS

- H0 :Los animales alimentados con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum* y sometidos a esfuerzo físicos extenuantes observan los mismos daños inmunológicos y oxidativos que los que hacen ejercicio y no consumen PD.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

CAPITULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

2.1 LA LOCOMOCIÓN COMO ADAPTACIÓN DEL SER HUMANO AL MEDIOAMBIENTE

Los seres multicelulares desarrollaron en su evolución órganos y sistemas que les permitieran mantener las mismas condiciones celulares que aquellas en las que se desarrollaron los organismos unicelulares, a través de un medio acuoso en el que el aporte de nutrientes fuera el adecuado para la demanda energética de un ser con millones de células. En el desarrollo de este sistema también se realizaron adaptaciones del resto de órganos a estas nuevas necesidades. Una vez desarrollados las vías metabólicas para producir energía, los seres vivos han ido evolucionando para conseguir mantener el aporte de fuentes energéticas a dichas vías. Para ello, era necesario desarrollar un sistema de desplazamiento y locomoción para obtener alimentos y para huir de los depredadores *(5)*

Conjuntamente al desarrollo del aparato locomotor se desarrollaron otros sistemas y aparatos para asegurar la ingesta, difusión y transporte y metabolización de los nutrientes y del oxígeno; otros de respuesta ante situaciones de emergencia, etc. Pero todos ellos relacionados con el desarrollo de los sistemas de locomoción. Esto nos hace pensar que el movimiento no es una capacidad secundaria y aislada del ser humano, sino que su funcionalidad se encuentra íntimamente unida al funcionamiento del resto de órganos

De esta forma, la mayoría de los órganos se fueron modificando para adaptarse al nuevo estímulo que suponía el movimiento (aumento del VO2, aumento de la producción de radicales libres, aumento del gasto cardiaco y de las demandas circulatorias, etc.) en su objetivo final de sobrevivir. Así, el estímulo necesario para el buen funcionamiento de cada órgano está relacionado, desde un punto de vista filogenético, directamente con el aumento de sus demandas funcionales debidas al movimiento *(4)*.

A partir de esos estadios iniciales de la evolución, el sistema locomotor evolucionó según surgieron nuevos estímulos relacionados especialmente con la necesidad de huir de los depredadores. Y quizás, el momento en que se detuvo la evolución morfológica / somática del ser humano, y especialmente de su sistema de locomoción, coincidió con el desarrollo del cerebro, permitiéndole crear nuevos modelos de actuación para enfrentarse a un medio ambiente hostil. Este momento parece estar centrado en el paso de *homo sapiens*, al *homo sapiens sapiens*, en el que el cerebro aumento en 1400 gr con relación a sus antepasados, proceso que duró miles de años *(1)*.

En resumen, la evolución de la especie humana se ha desarrollado en torno a un principio esencial: *la necesidad de movimiento*. Dicha proceso no es tan sólo una posibilidad que pueda ser utilizado o no, sino que la funcionalidad del resto

órganos está diseñada para responder ante el estímulo que supone el cuerpo en movimiento. Por ello, los mecanismos antioxidantes, el funcionamiento del sistema cardiovascular, etc. alcanzan su plenitud funcional ante el estímulo del ejercicio físico, ya que éste determina adaptaciones positivas para cada órgano.

Sin embargo, el sedentarismo que se ha instaurado en las sociedades occidentales, en contra de los procesos de evolución y adaptación del ser humano a lo largo de toda su existencia, ha llegado a tal extremo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha denominado al sedentarismo y sus consecuencias (obesidad, diabetes, etc.) como la epidemia no transmisible en este nuevo milenio.

2.2- ADAPTACIONES DE OTROS ÓRGANOS A LA CAPACIDAD DE LOCOMOCIÓN

Son bien conocidos los efectos benéficos del ejercicio físico. Sin embargo, también existe considerable evidencia del aumento durante su práctica de especies químicas altamente reactivas de oxígeno, lo que puede determinar daño oxidativo en varios tejido como; músculo, hígado, sangre y probablemente en muchas otras estructuras *(128),* debido a que el ejercicio físico demanda un mayor consumo de oxígeno y por tanto un aumento de las reacciones de estrés oxidativo con el subsecuente daño tisular por la generación de radicales libres de oxígeno *(129).*

El daño por estas especies reactivas del oxígeno depende de varios factores como es; la intensidad y duración del esfuerzo, el grado de entrenamiento, el tipo de ejercicio *(129)* el tipo de contracción muscular: excéntrica o concéntrica *(130*), el consumo máximo de oxígeno del individuo *(131),* al tipo de fibra muscular *(132)(133),* la edad *(134)* y al estado nutricional y de salud de los individuos *(135)*

Davies KJA et al (1982)(136), observaron un aumento de radicales libres en los músculos gastronemio, sóleo, plantar y en el tejido hepático de ratas machos *Long Evans* sometidas a un ejercicio físico extenuante tanto en aquellas que fueron alimentadas con dosis suficiente de VE (21 UI/kg) y con dosis insuficiente (menos 1 UI/kg). También se determinaron índices de control respiratorio mitocondrial (ICRM), donde la señal de resonancia paramagnética electrónica (EPR) para los radicales libres aumentó tres o cuatro veces en músculo e hígado, siendo mayor en las ratas deprivadas de VE. Estos datos sugerían un aumento en la producción de radicales libres con el ejercicio posiblemente a nivel mitocondrial, con el subsecuente daño a las membranas y alteración de su permeabilidad por peroxidación lipídica, además de la importancia de la actividad antioxidante para reducir el daño inducido por la actividad intensa.

La peroxidación lipídica determina modificaciones en las características de las membranas celulares, disminuyendo la permeabilidad, fluidez, mantenimiento de gradientes iónicos etc *(131*), siendo la vía de peroxidación la misma tanto en reposo, como en actividad física, pero con un incremento de las reacciones en ésta última *(137)*

Utilizándose para su valoración el etano y pentano del aire espirado durante o después del ejercicio o algunos marcadores del plasma sanguíneo, como TBARS o MDA o también directamente algunas muestras de tejido, cuantificando la disminución de las enzimas antioxidantes implicadas en evitar el daño de membrana *(138). Meydani M. (139)*, observó que la peroxidación lipídica medida por las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), aumentaron con el ejercicio en el músculo e hígado de las ratas alimentadas con suplemento de VE, en los animales deprivados de esta vitamina, el aumento fue menor debido a que los niveles ya eran altos durante el reposo.

Otras experiencias similares con TBARS en muestras biológicas o en la medición de hidrocarbonos expirados, que dan cuenta de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, han reportado un aumento de éste luego del ejercicio.*(140).* Se han observado cambios del 60 al 100% en los niveles de malondialdehido, detectados en el stratum y corteza de animales sometidos a ejercicio exhaustivo a un 100% del VO_2 máx.*(141)* Sin embargo, no todos los estudios han reportado un aumento de la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio. La falta de coincidencia en los resultados puede deberse a las diferencias metodológicas y protocolos utilizados *(142)*.

En otro trabajo cuyo propósito era estudiar la funcionalidad mitocondrial en hígado y músculo de ratas alimentadas con aceite de oliva virgen o aceite de girasol y sometidas a un estrés oxidativo inducido por ejercicio se ha podido observar que la peroxidación lipídica producida por el ejercicio físico y la manipulación dietética puede comprometer la funcionalidad mitocondrial en las ratas alimentadas con la grasa poliinsaturada pero no con la monoinsaturada *(135)*.

Como también se ha observado que los músculos de las ratas jóvenes se evidencian menos daños oxidativos inducidos por el ejercicio que los músculos de las ratas viejas. Comprobándose que los radicales libres de oxígenos están implicados en el daño muscular tardío *(134)*.

La oxidación proteica es otro índice de daño oxidativo en el ejercicio a través del incremento de los carbonilos proteicos. Ciertos componentes aminoácidos de las proteínas como son; la histidina, arginina, lisina y prolina son sensibles a la oxidación catalizada por metales, formando grupos carbonilos en las cadenas laterales de las proteínas *(137)*.

Ya *Gohil K. (1987)(143)*, en un estudio en dos grupos de ratas *Sprague-Dawley* que entrenaban tres veces a la semana, el primer grupo ejercitaba sobre un treadmill durante dos horas a una velocidad de 30 m/min. y con un 15% de pendiente durante doce semanas y el segundo grupo corrió cinco minutos a 20 m/min. durante el mismo período. Al término de las doce semanas de entrenamiento la mitad de cada grupo fue sacrificado y se tomaron muestras de tejido muscular y hepático para la determinación de grupos carbonilos. Observó, que el contenido de grupos carbonilos se duplicó en los músculos de las ratas entrenadas comparado con el de las sedentarias. En el tejido hepático no se encontraron diferencias en este sentido y al término de las dos semanas de finalizado el ejercicio, el contenido de grupos carbonilos a nivel muscular había disminuido a niveles similares de los animales sedentarios.

En otro estudio *(144)* en ratas, divididas en tres grupos: sedentarias, semi-entrenadas y entrenadas, se pudo observar indicios de estrés oxidativo en el hígado pero no de oxidación proteica. Sin embargo, el músculo de las ratas entrenadas presentaba un incremento de grupos carbonilos que era el doble a las ratas sedentarias. No obstante, después de dos semanas posteriores al entrenamiento se volvía a los niveles normales de carbonilos en el tejido muscular.

En este mismo año *Reznick A.Z (1992)(138),* concluyó en un trabajo realizado con ratas sometidas a un programa de entrenamiento de cuatro semanas y posteriormente la mitad de la muestra a sesiones de trabajo físico extenuante que; un ejercicio de estas características puede crear un estrés oxidativo sobre las proteínas tisulares, que el daño oxidativo es diferente sobre la musculatura roja donde se produce una mejor protección antioxidante que la blanca y que al igual a la peroxidación lipídica el estrés oxidativo depende de la intensidad del ejercicio.

La importancia de la determinación de concentraciones de antioxidante, es que tienen una relación directa con el estrés oxidativo *(145)*.Los pacientes que sufren obstrucción pulmonar crónica y sometidos a esfuerzos físicos en cicloergómetro, evidencian estrés oxidativo, con un aumento de los niveles de glutation oxidado (GSSG) en sangre *(151)*.

De igual manera *Sen C.K et al (1994)(149)* observaron en ratas entrenadas a una intensidad de 24 m/min, un aumento significativo de la oxidación del glutation reducido (GSH), duplicándose el GSSG hasta un 200% y hasta un 72% en hombres sometidos a un esfuerzo físico extenuante sobre el treadmill. No obstante*, JI L.L et al. (1993) (152),* no observaron cambio en las concentraciones de GSSG después de dos horas de ejercicio en bicicleta ergométrica a un 70% del consumo máximo de oxígeno.

Sin embargo, en otro estudio con hombres semi-entrenados y sometidos a un esfuerzo de 90 minutos sobre el cicloergómetro a una intensidad del 65% del VO_2 max. Extrayéndose sangre durante el ejercicio y durante 4 días después de la prueba, se pudo observar que: Durante el ejercicio submáximo, el GSH disminuyó en los primeros 15 minutos, acompañado de un aumento del GSSG, en los restantes 75 minutos de ejercicio, la concentración de GSH disminuyó, aumentando el GSSG *(145)*. La declinación del GSH después del ejercicio sería por un aumento de formación de metahemoglobina y la producción de O_2-. que es rápidamente dismutado por H_2O_2 por la superoxido dismutasa. El H_2O_2 es eliminado por acción de la glutation peroxidasa en los eritrocitos, causando una marcada pérdida de GSH y acumulación de GSSG *(153)*.

2.3. ADAPTACIONES ENERGÉTICAS CELULARES VO_2.

La energía necesaria para soportar la actividad muscular proviene de la transformación de la energía almacenada en los alimentos en energía mecánica para conseguir la contracción muscular y el movimiento. Para cubrir las necesidades energéticas en cada momento el organismo dispone de almacenes de energía que puede utilizar con mayor o menor rapidez dependiendo de las necesidades de cada situación.

La principal molécula de almacenamiento de energía inmediatamente disponible es el adenosín trifosfato (ATP). Este modo de almacenamiento es común a prácticamente todos los seres vivos, siendo además el mecanismo más antiguo conocido. En esta evolución el siguiente estadio fue la glicólisis anaeróbica, que puede datar de 1.500 millones de años de antigüedad. Pero en el momento en que fue necesario contar con una suplementación energética por la necesidad del movimiento, se desarrollaron las vías de producción de energía aeróbicas, seguramente por la fácil disponibilidad de O_2 en el medio ambiente.

Dado que los principales sustratos energéticos son los ácidos grasos y la glucosa (y en casos extremos los aminoácidos), los almacenes de energía se encuentran en el tejido adiposo y muscular en forma de triglicéridos y de glucógeno. Estas moléculas pueden ser degradadas en ácidos grasos y en glucosa que pueden ser metabolizados a través de vías anaeróbicas (glucólisis anaeróbica) o aeróbicas (beta oxidación, ciclo de *Krebs* y cadena de transporte de electrones) con la participación final del oxígeno. Esta forma de producción de energía requiere un periodo de tiempo variable para su funcionamiento, lo que varía desde pocos segundos hasta algunos minutos.

De este modo, las adaptaciones para producir la energía necesaria para mantener el movimiento han evolucionado hasta un sistema complejo de

almacenamiento y vías metabólicas de producción de energía que satisfagan las necesidades desde el reposo hasta la actividad física de varias horas.

Para satisfacer las necesidades energéticas se desarrollaron estructuras celulares en donde realizar estos procesos. La mitocondria es el principal exponente de estos procesos evolutivos, siendo además común a la mayoría de los seres vivos. La estructura mitocondrial está rodeada por una doble membrana que envuelve la matriz mitocondrial, la membrana externa está en contacto con el citoplasma y constituye un saco cerrado que, a su vez, contiene la membrana interna *(154)*

Se cree que la membrana externa mitocondrial es una membrana bastante sencilla que está compuesta por un 50% de lípidos y un 50% de las proteínas, y que tiene, relativamente pocas funciones enzimáticas o de transporte *(155)*. Se caracteriza por invaginaciones denominadas crestas, las que penetran en la matriz mitocondrial, quedando un espacio entre membranas o espacio intercrestal *(147)*.

En la membrana mitocondrial interna es estructural y funcionalmente mucho más compleja que la membrana externa, en un 80% es proteína y contiene la mayor parte de los enzimas implicados en el transporte electrónico y en la fosforilación oxidativa *(157)*. Presenta limitaciones muy estricta sobre los tipos de sustratos, intermediarios y especies nucleótidas que pueden ser transportados a través de la misma al compartimiento matricial *(159)*. En ella se sitúa la cadena respiratoria que se caracteriza por la cohesión física con la cual sus componentes se mantienen unidos entre sí e integrados a la membrana *(158)*.

El componente hidrofóbico hace que la membrana interna sea impermeable a la mayoría de las moléculas polares, como protones y aniones hidroxilo *(159)*. Los diversos nucleótidos implicados en las reacciones de oxidación-reducción celulares como el NAD+, NADH, NADPH, FAD, $FADH_2$ y el coenzima A y sus derivados no son permeables a la membrana mitocondrial interna *(160)*. El componente hidrofóbico o sistema multienzimático es conocido también como cadena de transporte de electrones, una denominación que pone énfasis en que las reducciones y oxidaciones son fenómenos caracterizados por la ganancia o pérdida de electrones *(161)*.

Las principales enzimas o proteínas que actúan como componentes de la transferencia electrónica en el sistema mitocondrial son las deshidrogenasas ligadas al NAD+, la deshidrogenasa ligadas a flavina, proteínas ferrosulfuradas y citocromos *(158)*. El subcompartimento de la membrana interna, están constituidas por las enzimas succinato deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa, beta hidroxibutirato deshidrogenasa, citocromo b, c, c_1, a, a_3, carnitina,

translocasa de nucleótidos de adenina, de tricarboxilatos, de glutamato aspartato y F1-ATPasa responsable de la síntesis de ATP, proceso acoplado a la cadena respiratoria *(162)*.

El proceso simultáneo de oxidación y fosforilación de ADP es denominado fosforilación oxidativa *(156)*.Algunos componentes enzimáticos están asociados débilmente a la membrana interna mitocondrial, pero otros están unidos muy fuertemente a ella o son elementos estructurales de la misma *(163)*.

La composición enzimática de la membrana externa contiene monoanimo oxidasa, quinurenina hidroxilasa, nucleósido difosfato quinasa, fosfolipasa A, Acil graso CoA sintetasas, NADH citocromo c reductasa y colina fosfotransferasa *(164)* Sin embargo, la membrana interna es la más importante desde el punto de vista funcional, ya que contiene los componentes de la cadena respiratoria y las proteínas necesarias para la síntesis de ATP *(165)*. Mediante el uso de colato y desoxicolato es posible fraccionar la membrana mitocondrial interna en complejos característicos y, además, solubilizar las proteínas constituyentes de la cadena respiratoria *(166)*.

Otras proteínas, como la 3-hidroxibutirato-dehidrogenasa y las permeasas transportadoras de aniones y nucleótidos también se hallan integradas a la membrana mitocondrial interna *(167)*. La matriz mitocondrial contiene las enzimas solubles del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la glutamato dehidrogenasa y las enzimas de oxidación de ácidos grasos. En el caso de la oxidación de los ácidos grasos y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, los equivalentes de reducción, tanto en forma de NADH como de $FADH_2$, se producen en la matriz mitocondrial *(168)*

Para transducir esta reducción en energía utilizable, las mitocondrias poseen un sistema de transportadores electrónicos que se sitúan en la membrana mitocondrial interna, convirtiendo los equivalentes de reducción, en presencia de oxígeno, en energía utilizable *(169)*. El metabolismo oxidativo mitocondrial comienza con la decarboxilación oxidativa de compuestos como el piruvato, originado durante la glicólisis de azúcares en el citosol a acetil-CoA por el complejo enzimático piruvato dehidrogenasa *(170)*.

La oxidación de acetil-CoA es mediada por dos caminos metabólicos relacionados, por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, oxida acetil-CoA a dióxido de carbono y, en el proceso, reduce NAD+ a NADH. El segundo camino involucra una serie de reducciones y oxidaciones cuyo resultado neto es la reoxidación del NADH a NAD+ y la reducción del oxígeno a agua, siendo este proceso catalizado por la cadena respiratoria, y es aquí donde la energía de oxidación de sustratos es utilizada para la síntesis de ATP *(171)*.

El acetil-CoA es el intermediario central del metabolismo oxidativo, derivando de azúcares, ácidos grasos y aminoácidos *(172)*. Los ácidos grasos son degradados a acetil-CoA a través de la beta-oxidación cuyas enzimas se ubican en la matriz mitocomdrial, la degradación de los aminoácidos ocurre principalmente en el citosol, siendo muy importante la mitocondria en este proceso *(173)*.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial se encuentra en la membrana interna en una secuencia específica, ya que las proteínas de transferencia de electrones y otros transportadores se encuentran ordenados según un patrón secuencial *(161*). Los equivalentes de reducción se extraen de los sustratos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en la beta oxidación de los ácidos grasos e indirectamente de la glucólisis pasándose por la cadena de transporte hasta el oxígeno molecular *(168)*. Los electrones o equivalentes de reducción ingresan a la cadena de transporte de electrones a nivel del NADH o de la coenzima Q , a partir de las reacciones primarias de la deshidrogenaba ligada al NADA y a FAD, hasta el oxígeno molecular por medio de la cadena de chito romos *(158)*.

Algunos componentes de la cadena de transporte de electrones se ubican de manera asimétrica en la membrana mitocondrial. La citocromo c oxidasa que cataliza el último paso en la cadena se extiende desde la matriz hasta el espacio intermembrana. Esta proteína esta compuesta por 13 polipéptidos que contienen un hemo a, a_3 y tres átomos de cobre. Para su transferencia electrónica, se une a la oxidasa en la cara citosólica de la membrana, mientras que el oxígeno lo hace por la cara que da a la matriz *(162)*.

La cadena de transporte de electrones donde se produce la respiración mitocondrial o fosforilación oxidativa, que es la principal fuente de energía en moléculas de ATP, se encuentra formada por cinco complejos situados en la membrana interna de la mitocondria *(160)*.

El complejo l, NADH: ubiquinona dehidrogenasa (NADH-DH). El NADH es un nucleótido con electrones de alta energía proveniente del ciclo del ácido cítrico. El complejo l transfiere dichos electrones del NADH por acción de la NADH dehidrogenasa a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ) y luego al succinato, que es el siguiente paso en la cadena de transporte. Al pasar de un transportador al siguiente, los electrones liberan energía que es utilizada por el complejo l para bombear protones (H+) de la matriz al espacio intermembrana. Esto genera un gradiente de transmembrana que termina activando a la enzima ATPsintetasa o ATPasa. Cada complejo en la cadena respiratoria tiene mayor afinidad por

electrones que su predecesor, a su vez, éstos van perdiendo energía a medidas que recorren la cadena *(162)*

El complejo ll, succinato-ubiquinona reductasa. Este complejo enzimático transfiere electrones del succinato a la CoQ. En esta etapa no se produce translocación de protones a través de la membrana y por lo tanto el Complejo ll es un simple transportador entre el Complejo l y el lll al complejo del citocromo bc_1.

El complejo lll, citocromo bc_1 transporta electrones de la CoQ al citocromo c. En esta etapa hay translocación de protones. El citocromo c acepta entonces electrones para trnsportarlos posteriormente a la citocromo oxidasa, en la que el oxígeno molecular es el aceptor de electrones terminal.

El complejo lV, este complejo hace uso del citocromo c como sustrato y está formado por la enzima citocromo oxidasa. La enzima toma cuatro electrones del citocromo "c" y los transfiere a dos moléculas de oxígeno formando agua, siendo la única forma del oxígeno de adquirir cuatro electrones. En esta etapa hay translocación de protones. En esta secuencia de reacciones, los protones (H+) son expelidos desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana en el complejo l, lll y lV.

El complejo V, constituido por la enzima ATPasa que funciona en forma reversible. La enzima aprovecha la energía generada por la translocación de protones en los complejos l, lll y lV para sintetizar ATP que es el objetivo final de todo este mecanismo. Actuando en forma reversible, la ATPasa puede a su vez, hidrolizar el ATP para bombear, contra gradiente, electrones desde el espacio intermembrana hacia la membrana, o sea el mecanismo inverso que se verificaba en los complejos l, lll, y lV *(174)*

Según el sitio en la cadena respiratoria donde actúan los inhibidores de transporte de electrones se pueden agrupar en tres. El primer grupo actúa sobre el NADH-dehidrogenasa, bloqueando la transferencia de electrones entre la flavina y la ubiquinona y se les denomina inhibidores del sitio l *(156)*. Otros bloquean la transferencia entre el citocromo b y el citocromo c_1, llamados inhibidores del sitio ll. Los que actúan sobre el hemo a_3 de la citocromo oxidasa impidiendo su interacción con el oxígeno se les denomina inhibidores del sitio lll *(174)*.

Los sitios de conservación de energía o de fosforilación, se admite que están ubicados en la cadena respiratoria cerca del NADH-dehidrogenasa en el primer sitio, como también en el sector citocromo b citocromo c_1 en el segundo sitio y, por último, en el tercer sitio, en el sector citocromo oxidasa-oxígeno. Lo que es

una consecuencia de las propiedades termodinámica de la cadena respiratoria o de los potenciales redox de los transportadores de electrones *(175)*.

La reacciones de oxidación de sustratos en las mitocondrias dependen de la presencia de ADP y fosfato inorgánico. El control respiratorio y el índice de la relación entre el fosfato incorporado al ATP y el oxígeno utilizado en oxidar el sustrato, son muy usados para expresar el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y de fosforilación. Valores bajos de control respiratorio o de índice indican mitocondrias dañadas o desacopladas *(176)*.

Existen desacoplantes e inhibidores de la fosforilación oxidativa. Los desacoplante estimuladores de la respiración, están constituidos por fenoles sustituidos, hormonas tiroideas, dicumarol, fenilhidrazonas de cianuro de carbonilo, ácidos grasos de cadena larga y algunos antibióticos, que tienen la propiedad de disipar el potencial electroquímico de protones *(177)*. Disipándose en forma de calor la energía desacoplada en las mitocondrias. Los inhibidores afectan de igual manera a la respiración y a la fosforilación pero no en el transporte de electrones en mitocondrias desacopladas *(178)*.

La concepción quimioosmótica del mecanismo de acoplamiento se basa en la teoría de *Mitchell. P (179),* que consiste en tres postulados:

a) La membrana interna es impermeable a protones y a hidroxilos

b) La cadena respiratoria transloca protones hacia el medio extramitocondrial citosólico en un proceso vectorial acoplado al transporte de electrones a través de los sitios de conservación de energía

c) La ATPasa es una enzima que transporta vectorial y, reversiblemente, protones con una estequiometría característica, dos protones por Pi incorporado (o liberado) del ATP. La síntesis de ATP se relaciona con la entrada de protones a la matriz mitocondrial.

La exclusión de protones desde la membrana interna hacia el espacio intermembrana se produce por la energía liberada en la reacción redox, transportándose los electrones a través de la cadena respiratoria. Permitiendo este proceso la reentrada de protones hacia el interior forzando a la enzima ATP sintetasa, que cataliza la formación de ATP, a completar el proceso de fosforilación oxidativa *(179)*.

Todas estas estructuras y mecanismos de producción de energía los comparte el ser humano con el resto de seres vivos, pero solamente en el caso del ser humano, la actividad física ha sido sustituída por el sedentarismo.

2.4. EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO

2.4.1. Radicales libres

El oxigeno es esencial para la vida de los organismos aerobios, y su mayor parte el 98% o más, es utilizado para la generación intracelular de energía, la cual es liberada durante las oxidaciones biológicas y almacenada por las células en forma de adenosinatrifosfato (ATP) *(180)*. El oxígeno actúa como aceptor final de electrones liberados durante la oxidación de nutrientes, al adquirir un total de cuatro electrones por molécula con producción de dos moléculas de agua *(181)*. Esta reacción es catalizada por la enzima citocromo "c" oxidasa, localizada al término de la cadena respiratoria mitocondrial *(182)*. La cadena respiratoria, constituye por lo tanto la mayor fuente de estas especies reactivas del oxígeno llamados radicales libres *(162)*.

Un radical libre (R.) es una molécula, o un fragmento de molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en un orbital externo *(183)*. En 1969 *McCord y Fridovich* sugirieron por primera vez, que la química de los radicales libres, hasta entonces un tema de interés tan solo para los físicos de alta energía o los biólogos de la radiación, podría formar parte integrante del metabolismo normal *(184)*.

La reducción total de oxígeno en los sistemas biológicos consiste en la aceptación de cuatro electrones, con la formación final de agua. Sin embargo, en algunas células pueden tener lugar procesos de reducción parcial del oxígeno, originándose compuestos intermediarios altamente reactivos.

Los R. se forman de diversas maneras:

Cuando una molécula "A", de número par de electrones, pierde o gana uno de ellos, se forma un radical

$A \pm e \Rightarrow A\bullet$ ("$\bullet$" representa el electrón no pareado)

a) Cuando una molécula "B-C", formada por dos fragmento B y C, sufre una excisión o rotura (homólisis) conservando cada una de ellos un electrón

$C - D \Rightarrow C\bullet$ y $D\bullet$

Si una molécula pierde uno o más electrones sufre una oxidación, mientras que si los gana se trata de una reducción. Al conjunto de ambas se denomina proceso redox.

Los más importantes son el radical superóxido (O_2-.), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH.). Ya en *1966 y 1967, Jensen y Hinckle* y col., indicaron que la cadena respiratoria mitocondrial era capaz de producir H_2O_2.

En 1971, *Loschen y col.*, mostraron la formación de H_2O_2 en mitocondrias de corazón de paloma y su relación con el estado metabólico mitocondrial, mientras que *Boveris y col., en 1972* determinaron las propiedades generales de la producción mitocondrial de H_2O_2 en mitocondrias de hígado de rata. Las observaciones iniciales se extendieron a mitocondrias aisladas de diversos sistemas vivos, incluyendo mamíferos, aves, invertebrados, organismos unicelulares eucariotas, y plantas; con lo que la producción de H_2O_2 es considerada como una propiedad mitocondrial *(182)*.

Por otro lado, la producción de O_2-. por membranas mitocondriales fue informada por primera vez por *Loschen y col., y luego Boveris y Cadenas* mostraron que el O_2-. es el precursor estequiométrico del O_2-.mitocondrial.

Dada la estructura electrónica del oxígeno, esta molécula sólo puede aceptar electrones de a uno por vez, y la mayoría de las reacciones de oxidorreducción dentro de la célula involucran no más de dos electrones *(185)*. Por lo tanto, cuando la molécula de oxígeno choca con un dador de electrones puede tomar un solo electrón, produciendo (O_2-.) y no más de dos, convirtiéndose en H_2O_2.

Dentro de la célula sólo la enzima citocromo oxidasa puede transferir los cuatro electrones al oxígeno en forma casi simultánea para generar agua *(174)*. En condiciones normales las concentraciones intracelulares de O_2-. e H_2O_2 han sido estimadas en 10^{-9} y 10^{-6} - 10^{-7} respectivamente *(186)*. La reacción entre estas dos especies en presencia de metales, hierro intracelular, lleva a la formación del otro radical, el radical hidroxilo (OH.), uno de los oxidantes más potentes que existen, capaz de abstraer átomos de hidrógeno de cualquier molécula biológica como, el ADN, lípidos, polisacáridos del líquido sinovial, etc., para formar agua *(180)* .

Otras situaciones en las que aumentan las especies oxidantes son por el aumento de la concentración de oxígeno, dado que la producción de O_2-. e H_2O_2 ocurre como consecuencia de reacciones no enzimáticas, la velocidad de producción de estos oxidantes por diferentes sistemas intracelulares aumentan linealmente con la concentración de oxígeno *(187)*.

Por ejemplo, el aumento de la concentración de oxígeno del aire de veinte por ciento a cien por ciento, hiperoxia, produce lesiones pulmonares irreversibles que llevan a la muerte en pocos días *(188)* pero que pueden prevenirse si se elevan los niveles intracelulares de defensas antioxidantes *(180)*. El aumento de la concentración de oxígeno, se traslada a los tejidos y en el caso del cerebro produce convulsiones y eventualmente la muerte *(189)*.

La fuente intracelular más importante de O_2-. e H_2O_2 es la mitocondria, capaz de reducir parcialmente el oxígeno en dos lugares de la cadena respiratoria: uno, en la primera enzima de la cadena llamada NADH deshidrogenas y, el segundo, en consecuencia de la autooxidación de la quinona coenzima Q o ubiquinona *(190)*. Otras fuentes intracelulares incluyen los peroxisomas *(191*) y un grupo de sistemas enzimáticos llamados mono y dioxigenasa, pero, con excepción del hígado, la contribución de estos últimos a la concentración total de O_2-. e H_2O_2 es relativamente menor *(192)*.

Otras de las fuentes normales de O_2-. son los leucocitos polimorfonucleares, cuya función involucra específicamente la generación de estos oxidantes por el sistema NADPH oxidasa *(193),* como primera línea de defensa contra posibles agentes patógenos. En este caso, la generación de agentes oxidantes cumple un papel beneficioso ya que impide la proliferación de tales agentes *(194)*. Mas aún, la deficiencia genética del sistema causa una enfermedad letal, la granulomatosis crónica *(195)*.

Estas células polimorfonucleares eliminan estos agentes mediante la producción activa de O_2-. y H_2O_2. Sin embargo, en condiciones patológicas, como en las enfermedades autoinmune, este proceso puede también dañar al propio organismo causando inflamación *(196)*. Los procesos inflamatorios pueden, también, hallarse asociados a los estadios terminales en muchas patologías, incluso el daño por hiperoxia, donde la lesión inicial por oxígeno estimula la migración de células polimorfonucleares, las que se activan y propagan el daño inicial *(197)*. Estos procesos inflamatorios han sido recientemente implicados en el daño que ocurre durante la reperfusión de tejidos isquémicos *(198)*.

Recientemente se ha identificado una nueva especie oxidante llamada peroxinitrito *(199)(200*), que se produce normalmente como consecuencia de la reacción entre el O_2-. y el óxido nítrico (NO.). El NO. es un metabolito normal en el metabolismo celular producido por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa sobre el aminoácido arginina *(201)(202)*, también se forma en las células cerebrales y leucocitos difundiendo posteriormente hasta el músculo liso vascular, donde activa la guanilato ciclasa, dando lugar a un aumento en la producción del guanosin -3'-5' -monofosfato cíclico (GMPc) y la disminución del calcio intracelular *(203)*.

Fisiológicamente, el NO: es un vasodilatador generado por las células endoteliales y macrófagos *(204)*, pero el producto de la reacción con el O_2-. es un oxidante casi tan poderoso como el OH. El papel del peroxinitrito ha sido identificado como uno de los oxidantes liberados por las células de macrófagos como mecanismo de protección *(205)*. Investigaciones recientes involucran oxidantes derivados del NO. en procesos tales como la apoptosis o muerte celular programada genéticamente, en particular en el sistema nervioso *(206)*.En pequeñas cantidades, el óxido nítrico es importante en la homeostasis del aparato cardiovascular y del sistema nervioso *(207)*. Sin embargo, su aumento excesivo de esta molécula, sintetizada principalmente por la NO. sintetasa inducible (INOS) de los fagocitos como mecanismo de defensa antibacteriana, puede ejercer una acción tóxica en los tejidos *(206)*.

También, en los últimos años, se realizaron numerosos estudios con el fin de caracterizar el rol de la enzima xantina oxidasa en el daño ocasionado por la reperfusión de tejidos isquémicos *(208)*. De acuerdo con esta hipótesis la enzima xantina dehidrogenasa, una proteína que oxida la xantina produciendo NADH, se convertiría en una fuente intracelular de O_2-. y H_2O_2 durante el período isquémico, con la transferencia de electrones directamente al oxígeno en el momento de reiniciar la reperfusión. Si bien esto puede ocurrir en tejidos ricos en xantina dehidrogenasa, como el intestino *(209)*.

Se ha demostrado que esta enzima no está presente en el corazón humano, de modo que su papel en el daño por isquemia y reperfusión ha sido severamente cuestionado *(210)*. La xantina oxidasa participa en el catabolismo de las purinas produciendo una oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico, pudiendo ser encontrada en dos formas: dehidrodenasa (XDH) que utiliza NAD + como aceptor de electrones, y la forma oxidasa (XO) que utiliza oxígeno molecular como aceptor de electrones *(211)*.En condiciones normales, cerca del 98% del oxígeno reducido es catabolizado por el complejo citocromo oxidasa en la mitocondria, produciendo O_2-. y H_2O_2, según el numero de electrones que se reduzcan en el oxígeno molecular se producen O_2.-, H_2O_2 o OH *(212)*.

En cuanto al superóxido, es una sustancia químicamente reductora y moderadamente oxidativa, que también puede iniciar reacción radical libre. Es citotóxico en gran número de circunstancias, como son la toxicidad del oxígeno, inflamación mediada por células fagocíticas, lesión por isquemia y daño por radiaciones y drogas *(180)*.

Los efectos de compuestos exógenos como, drogas de uso farmacológico entre ellas, la adriamicina (ADM), sustancia que posee efectos colaterales sobre el miocardio con desarrollo de miocarditis y subsecuente insuficiencia cardíaca *(213)*. Varios estudios clínicos en pacientes que recibían ADM, revelaron la presencia de alteraciones del ritmo cardíaco, depresión del segmento ST y cambio en la onda T. Pero recién cuando se llevó a cabo un análisis retrospectivo sobre casi 400 enfermos, se pudo establecer firmemente la cardiotoxidad de la droga *(214)*

Más recientemente, un estudio con seguimiento a largo plazo, reveló que los pacientes que se encontraban sin síntomas de miocarditis, en el momento de la remisión del tumor, desarrollaron cardiopatías entre cuatro y veinte años *(215)*.Así también como pesticidas *(Paraquat)*, pueden ser químicamente reducidas a través de reductasas intracelulares y formar especies inestables. En presencia de oxígeno, estas especies se autooxidan formando O_2-. y regenerando la droga inicial que puede ser reducida nuevamente *(216)*.

Todos los compuestos tóxicos (tetracloruro de carbono o benzopireno) pueden ser convertidos en potentes radicales oxidantes en reacciones intracelulares, particularmente en el hígado donde, eventualmente, producen serias lesiones, incluso cirrosis y cáncer *(217)*. Las radiaciones ionizantes (rayos x y gamma) ocasionan la ruptura de moléculas de agua produciendo OH. y dan inicio a la oxidación de múltiples componentes celulares como son los lípidos, ADN, etc *(218)*.

2.4.2. Daño oxidativo sobre estructuras orgánicas

Son múltiples los estudios que han sugerido la hipótesis del envejecimiento y del desencadenamiento de diversas enfermedades degenerativas relacionadas con el aumento del estrés oxidativo *(228)*. Según estas hipótesis, cada individuo nace con una capacidad máxima de fosforilación oxidativa cuya eficiencia declina con la edad *(229)*. Algunos autores han descrito que el número de fibras musculares esqueléticas y cardíacas deficientes en citocromo "c" oxidasa se incrementan progresivamente con la edad *(230),* y que las actividades específicas de los complejos l y lV de la cadena transportadora de electrones se deterioran con la edad, tanto en tejido cardíaco como esquelético *(229)*.

Una de las posibles causas de la menor eficiencia de la fosforilación oxidativa como también de la alta velocidad de mutación del ADN mitocondrial sería debido a su daño, por los radicales libres de oxígeno *(231)*. La frecuencia de mutaciones del ADN mitocondrial es cinco a diez veces superior que la del ADN nuclear *(232),* aparentemente debido a la concentración en estado estacionario del O_2-. la cual es diez veces superior dentro de la mitocondria que en el citosol *(233)*.

Se ha considerado también que esta diferencia puede deberse a la carencia de histonas que protejan al ADN mitocondrial y a la baja eficiencia de reparación por parte de la mitocondria, del ADN dañado *(233),* como también a su cercanía con la membrana interna *(229)*. Por lo tanto, la principal fuente de oxidantes parece ser la mitocondria como principal factor de envejecimiento celular *(234)*.

2.4.3. Daño de membranas

El efecto sobre los lípidos se ejerce fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados *(235)*. En los lípidos se inicia el proceso por la acción de varios radicales libres de oxígeno (OH.,O_2-.y H_2O_2) sobre un carbono metileno de la cadena del ácido graso, al que arranca un protón dejando un electrón no apareado con lo que se genera un radical lipídico *(236),* originándose un dieno conjugado, que reacciona con el oxígeno molecular para formar un radical lipídico hidroxiperoxil, que a su vez puede actuar sobre otro nuevo ácido graso poliinsaturado PUFA (polyunsaturated fatty acid) iniciando otro nuevo ciclo *(237)*.

Los ácidos grasos (PUFA) poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble ligadura, que les confiere una zona de enlace lábil que permite que una molécula activa como el OH. les sustraiga un átomo de H, este proceso de oxidación se llama lipoperoxidación *(238)*. La etapa de iniciación se produce cuando la unión C-H de los PUFA sufre la abstracción del hidrógeno de la doble ligadura susceptible de ser abstraído por los radicales libres, fundamentalmente el OH. lo que genera un radical lipídico *(239)*. La reacción finaliza por la unión de dos radicales libres generando como productos finales aldehidos, hidrocarburos y residuos químicos como, el malondialdehido *(240)*.

Los aldehidos son moléculas muy reactivas pero no son radicales libres, se consideran como componentes de la toxicidad del estrés oxidativo, provocando la lesión de la célula y de las que se están produciendo por peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática y de las organelas intracelulares *(237)*. Por otro lado también, los productos químicos terminales pueden difundir fuera de

la célula y provocar edema, alterar la permeabilidad endotelial y generar sustancias quimio-atractantes *(241)*

La gran mayoría de los métodos de laboratorio determinan el daño por radicales libres o cuantifican el estrés oxidativo, dosando los productos oxidados de los PUFA, estos métodos incluyen el dosaje de malondialdehido *(242)*, el estudio de dienes conjugados *(243)* y la medición de la energía lumínica que producen las moléculas terminales de la lipoperoxidación *(244)(245)*. Empleándose en diversos estudios como por ejemplo en la determinación del daño por adriamicina en corazones de conejo *(246)* y, en la clínica médica, para establecer el estrés oxidativo en cirugía cardíaca *(247)*

Su acción sobre las proteínas se observa principalmente sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol (-SH) de los aminoácidos *(184)*. Las proteínas ricas en determinados aminoácidos como son, el triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína, pueden sufrir alteraciones estructurales y funcionales, que pueden derivar a la pérdida de la actividad enzimática, a la alteración estructural por rotura o por formación de puentes disulfuro intra o intercatenarios *(248)*.

El daño de los radicales libres sobre las proteínas depende de su composición en aminoácidos, a la importancia y localización de los aminoácidos que median la conformación y actividad de la proteína, así como la reparación de la lesión. El O_2-. y el H_2O_2 puede transformar la hemoglobina en metahemoglobina y otros productos de oxidación *(249)* la relación entre hemoglobina y radicales libres de oxígeno estimula la peroxidación de los lípidos de membrana *(250)*. El H_2O_2 o radicales lipídicos son capaces de liberar hierro de la hemoglobina, facilitando la reacción *Haber Weiss (251)*. Por otro lado, la ingestión de hemoglobina por los macrófagos alveolares disminuye la producción de O_2-.*(252)*.

En el caso de los carbohidratos, los monosacáridos actúan como limpiadores (scavengers) del radical superóxido e hidroxilo *(253)*. No obstante, los polisacáridos son destruidos por la acción de los radicales libres de oxígeno *(254)*. Varios radicales libres son capaces de degradar glicoproteínas del moco de la mucosa traqueo bronquial *(251)*. Existen mecanismos endógenos o exógenos para prevenir la acción de los radicales libres de oxígeno *(255)*. Pudiendo estos también eliminar directamente los radicales libres, en cuyo caso se les denomina scavengers, o bien bloqueando la generación de éstos a sus efectos deletéreos *(256)*

2.4.4. Daño del ADN y ARN

La producción excesiva de radicales libres in vivo por fuentes endógenas o exógenas, pueden dañar biomoléculas, incluyendo el ADN *(219)*. La reacción de los radicales libres de oxígeno con el ADN puede producirse en el esqueleto azúcar-fosfato como, en la base *(220)*. Conduciendo esta reacción a la fragmentación del azúcar, a la pérdida de una base con parte del residuo de azúcar que aún permanece unido y al corte de la cadena *(221)*.

El ataque sobre las bases tales como timina y adenina resultan en el daño sobre ellas, aunque se ha documentado el daño al ADN por radicales del oxígeno, no está claro cuál o cuáles de los oxidantes causan el daño *(222)*. Ni el O_2-. ni el H_2O_2, bajo condiciones fisiológicas, parecen causar roturas de cadenas del ADN o modificaciones de las bases *(223)*. Se ha propuesto que la toxicidad in vivo del O_2-. y del H_2O_2 se produce por su conversión, dependiente de una reacción no enzimática catalizada por hierro, a una especie radical altamente reactiva, el radical OH *(224)*. Esto lleva a alteraciones en la duplicación y transcripción que explican la asociación de la generación de radicales libres de oxígenos con la carcinogénesis y con el envejecimiento *(225)*.

Estudios de patologías causadas por mutaciones del ADN mitocondrial sugieren que una variedad de enfermedades degenerativas puede estar asociada con defectos de fosforilación oxidativa *(226)*. Se han identificado una serie de alteraciones del ADN mitocondrial que incluyen mutaciones por sustitución de bases, inserciones deleciones, mutaciones nucleares que predisponen a la célula a las deleciones del ADN mitocondrial y a alteraciones del número de copias *(227)*

Los ácidos nucleicos, que como hemos podido mostrar, son blanco del ataque oxidativo, pueden constituir un componente importante de un daño celular cuyas consecuencias se puedan cuantificar más a largo plazo. *Packer, L (1997) (145)* estudió en once voluntarios de sexo masculino que realizaban 90 minutos de ejercicio en cicloergómetro durante tres días seguidos a una intensidad de un 65% del VO_2max., determinándose el volumen urinario durante 24 horas previas a la primera prueba. Luego de esta última, los sujetos iniciaron diariamente y por un mes la siguiente suplementación con antioxidante: VE alfa-tocoferol 533 mg, VC 1000 mg; beta -caroteno 10 mg. Al término de este período se repitieron las pruebas de ejercicio y la recolección de orina.

El daño oxidativo de los ácidos nucleicos fue determinado midiendo la concentración de 8- hidroxiguanosina (8- OHG) en orina, se observó que la excreción urinaria de ARN 8-OHG no se modificó durante los tres días de ejercicio respecto a los valores básales, ni se alteró con la administración de

antioxidantes. La conclusión fue que el ejercicio había sido más bien moderado y que sería necesario probablemente un ejercicio mayor para observar daños en los ácidos nucleicos.

Sin embargo, también debe ser considerado que los sujetos de esta experiencia eran medianamente entrenados y se sabe que el entrenamiento reduce el daño oxidativo inducido por el ejercicio *(147)*. Esto se ha observado en nadadores con un entrenamiento regular en quienes se ha visto una disminución de la 8-OHG nuclear de linfocitos luego de un ejercicio de agotamiento rápido. Este hallazgo sugiere que la reparación del daño oxidativo en el ADN aumenta con el entrenamiento *(148)*.

En otro estudio realizado con maratonianos se deja en evidencia la gran diferencia entre los niveles de 8 - hidroxy 2- deoxiguanosina en orina encontrada en el descanso y a las diez horas postmaratón *(147*), demostrando que el trabajo de larga duración, de cierta intensidad y sin carga es capaz de incrementar los ácidos nucleicos oxidados en orina *(181)*.También se ha encontrado aumentos significativos en la rotura de cadenas del ADN de leucocitos al término de ejercicios de variada intensidad, pero no se encontró correlación entre la intensidad y el grado de alteración del ADN *(149*).

De igual forma se ha podido comprobar en sujetos sometidos a pruebas de esfuerzo sobre cinta rodante, un aumento en la rotura de cadenas del ADN de leucocitos de sangre periférica, extraída 24 horas después del ejercicio. Este efecto se reducía en un 80% de la población estudiada cuando se administraba VE en dosis de 1200 mg/día durante catorce días previos a la prueba *(134)*.

2.5. DISFUNCIÓN INMUNOLÓGICA

Las respuestas agudas del sistema inmune ante el ejercicio físico vienen centradas en un aumento de los leucocitos (leucocitosis) relacionada con el aumento de las catecolaminas; en una disminución de los linfocitos (linfopenia) relacionada con el aumento del cortisol; disminuciones transitorias de Ig M y Ig G durante el ejercicio *(249)*; y secreción de citoquinas proinflamatorias inicialmente (IL-1, IL-6 y TNFα) seguida de otras antinflamatorias (IL-1ra, TNF-rs, IL-10) durante la recuperación. La secuencia de esta secreción ha sido descrita por *(261)* según el siguiente esquema:

1. Los niveles más altos de IL-6 se encontraron inmediatamente después del ejercicio

2. La IL-1ra alcanzó sus valores más elevados (100 veces los valores básales) en la primera hora de recuperación

3. Los valores de TNFα, TNF-rs1 y TNF-rs2 alcanzaron sus picos máximos en la primera hora de recuperación

4. La IL-10 alcanzó sus valores máximos justo al finalizar el ejercicio

Estas respuestas sugieren que la respuesta inflamatoria promovida por el ejercicio de alta intensidad está equilibrada parcialmente por la secreción de citoquinas antinflamatorias. A pesar de esta respuesta, el resultado neto del ejercicio es una inflamación, tanto más evidente cuanto mayor es la intensidad del ejercicio *(265)*. De hecho, el ejercicio físico ha servido como modelo inflamatorio de investigación *(261)*, dado que tras el ejercicio aparecen las respuestas inflamatorias clásicas, como movilización y activación de granulocitos, linfocitos y monocitos, liberación de factores inflamatorios y mediadores solubles, implicación de sustancias reactivas de la fase aguda; activación del complemento y de otros mecanismos en cascada relacionados con la inflamación. Sin embargo, a pesar de la demostración repetida de las respuestas del sistema inmune inducidas por el ejercicio, los mecanismos subyacentes y moduladores de dichas respuestas aun no han sido totalmente clarificados *(275)*.

Estas respuestas inflamatorias, posiblemente relacionadas con el aumento del estrés oxidativo durante el ejercicio de alta intensidad, cuando se perpetúan en el tiempo debido a un insuficiente tiempo de recuperación y adaptación, conducen a una disfunción del sistema inmune relacionada con el aumento de los procesos catabólicos inducidos por los aumentos de los niveles de cortisol y de catecolaminas, que se caracteriza por un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias *(164)*.

Determinados ejercicios, como los de predominio excéntrico, producen mayor daño muscular caracterizado por aumentos más significativos de creatín fosfoquinasa (CK), y por elevaciones mayores de las citoquinas proinflamatorias, especialmente IL-1, IL-6 y TNFα *(459)*. Estos resultados demuestran la relación entre el daño muscular, el aumento de dichas citoquinas y el mantenimiento de los procesos inflamatorios como base de la disfunción inmunológica inducida por el ejercicio intenso. Otros factores que pueden contribuir a esta alteración son el aumento de la temperatura corporal, el descenso de la saturación de oxígeno, y la reducción de los niveles de glutamina *(164)*

La glutamina es el aminoácido libre más abundante en músculo y plasma, se utiliza principalmente en los procesos de división celular rápida, incluida la de los

leucocitos, para suministrar la energía suficiente y las condiciones óptimas para los procesos de biosíntesis de nucleótidos. Por ello, es una molécula considerada como esencial para el funcionamiento adecuado del sistema inmune. Se ha descrito un síndrome, denominado "Low CG syndrome", caracterizado por niveles plasmáticos reducidos de glutamina, cistina, baja actividad NK citotóxica, deterioro de la musculatura esquelética con aumento de los niveles de urea y presencia de fatiga *(245)*

Estos síntomas aparecen en infecciones como el SIDA, el cáncer, sepsis, enfermedad de Crohn, síndrome de fatiga crónica, y en los deportistas con sobrentrenamiento *(261)*. De igual forma, la disfunción inmune que aparece en el sobrentrenamiento aparece en todas estas patologías, así como en pacientes con insuficiencia cardiaca. Así, cada vez son más numerosas las patologías en las que se describe un proceso inflamatorio sistémico subyacente y común a todas ellas, con factores desencadenantes y perpetuadores comunes, como son el aumento del estrés oxidativo, el aumento de los procesos catabólicos y el aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias *(261) (164)*.

El ejercicio de alta intensidad o de duración prolongada de forma repetida, sin periodos suficientes de descanso y adaptación, han demostrado provocar una acción sobre el sistema inmunológico, cuyo efecto global es una inmunodepresión *(261)*. Diversos estudios han mostrado modificaciones marcadas de la funcionalidad del sistema inmune tras ejercicios máximos, relacionados con la fatiga mantenida *(398)*. Dichas alteraciones disminuyen la resistencia física y el rendimiento deportivo, lo que sugiere una estrecha relación entre el sistema inmune y la aparición de la fatiga aguda e incluso crónica.

2.6. DAÑO NECRÓTICO Y APOPTÓTICO.

El desequilibrio entre la demanda y el aporte de oxígeno celular producido por una isquemia de una determinada zona tisular, conduce a la muerte por necrosis. Pero, desde *1972, Kerr, Wyllie y Currie*, describieron otro tipo de muerte celular, que se produce en tres situaciones distintas: durante el periodo embrionario animal, en distintos tejidos con la finalidad de mantener la estructura tisular, y en algunos estados patológicos.

Si bien en el caso de la muerte por necrosis, las células se hinchan, pierden su integridad rompiéndose, y producen una reacción inflamatoria que finaliza con la formación de una cicatriz fibrosa, en el caso de la muerte no necrótica, las células se arrugan condensando su contenido, las membranas plasmáticas y de las organelas mantienen su integridad, y se produce una fragmentación celular que es fagocitada por macrófagos, sin liberación del contenido celular y por ello, sin reacción inflamatoria. Dado que en este caso el estímulo parecía provenir del

interior celular, se reforzó la hipótesis de un programa de muerte celular activado en determinados momentos en relación a estímulos ambientales, fisiológicos o patológicos. Este proceso es el denominado de muerte celular por apoptosis.

El significado de estos dos tipos de daño celular son bien diferentes. Por un lado, la necrosis siempre es un proceso patológico cuyos agentes desencadenantes son siempre factores tóxicos para la célula, mientras que la apoptosis la muerte se puede considerar como un proceso fisiológico desencadenado desde el interior celular, para el mantenimiento de los tejidos, o bien ser un proceso patológico sólo cuando exista una alteración de los mecanismos reguladores. De igual forma, la morfología de estos dos procesos es absolutamente diferente incluso a microscopia de luz, siendo muchas de ellas inequívocamente distinguibles a microscopía electrónica. El factor bioquímico más diferenciador entre ambos procesos es la necesidad de un determinado gasto energético en el caso de la muerte apoptótica. De igual forma, el tipo de fragmentación del ADN y la necesidad o no de síntesis de ARN y proteínas son características diferenciales de estos dos procesos.

Sin embargo, cada vez hay más datos científicos que inducen a establecer vínculos entre ambos mecanismos de daño celular. Parece claro, por ejemplo, que estos dos procesos pueden tener lugar en condiciones patológicas y que pueden contribuir al desarrollo de enfermedades a través de distintos mecanismos. Además de ello, un mismo agente desencadenante puede poner en marcha los procesos de apoptosis a dosis bajas, y desencadenar una necrosis a dosis elevadas. Este es el caso de algunas toxinas y de la hipoxia celular, que cuando es parcial puede desencadenar apoptosis y la ausencia completa de oxígeno desencadena la muerte por necrosis.

2.7. MECANISMOS ANTIOXIDANTES: ENZIMÁTICOS Y NO ENZIMÁTICOS

Las superóxido dismutasa (SOD), se comportan como sistema antioxidante encontrándose en tres formas según su distribución celular y componente metálico; en el citosol del hígado y cerebro y en menor cantidad los hematíes del pulmón, en las mitocondrias y por último en el líquido interticial y el plasma *(257)*. La SOD favorece la eliminación del radical superóxido incrementando diez mil veces la reacción de dismutación espontánea *(258)*. Genera peróxido de hidrógeno por lo que en presencia de hierro libre puede presentar una acción pro-oxidante, debiendo ser complementada su acción con sistemas que eliminen H_2O_2, el sistema catalasa y ciclo del glutation *(259)*. Se ha demostrado que la

administración de SOD también disminuye la formación de radicales libres durante la reperfusión y, por tanto, mejora la lesión por reperfusión *(260)*.

Se ha observado, en modelos de hepatectomía parcial en ratas, que su administración disminuye la lipoperoxidación y favorece la regeneración hepática *(261)*. Durante la isquemia hepática disminuyen las concentraciones de SOD junto al incremento de las concentraciones de hipoxantina y xantina, mientras que en el postisquemia predomina el descenso de las concentraciones de ATP *(258*). Lo que justifica la administración exógena de SOD antes de la isquemia mejorando la funcionalidad hepática *(262)*.

La catalasa es una proteína que se ubica principalmente a nivel intracelular en los peroxisomas *(263)*. Los niveles enzimáticos de catalasa pulmonar es uno de los más bajos dentro de los diferentes tejidos, esta hemoproteína realiza la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua *(264)*. Existen estudios experimentales que demuestran el efecto protector de la catalasa exógena en la lesión por radicales libres de oxígeno inducida por vía xantinoóxidasa *(265),* o de la lesión pulmonar secundaria a la endotoxemia *(266)*, al parecer por un descenso en los niveles de catalasa pulmonar y que las defensas antioxidantes procederían de otros órganos, como el hígado *(267)*.

El ciclo de glutation por poseer una distribución citosólica, tiene una mayor actividad antiperoxidásica que el sistema catalasa, posee un mejor contacto con los radicales libres de oxígeno producidos en las células *(268*), se estimula antes y tiene la capacidad de detoxificar no sólo los H_2O_2 sino también otros hidroperóxidos *(259*).

La glutation peroxidasa (GSH-PX) es importante en el ciclo del glutation, cataliza la reducción de H_2O_2 mediante la oxidación de glutation *(269)*. El glutation oxidado (GSSG) reacciona con proteínas que tienen grupo tiol lo que determina su capacidad lesiva, eliminádose al exterior de la célula a través de la membrana plasmática, como también. por la enzima glutation reductasa que genera glutation reducido (GSH) necesitando de NADPH como agente reductor, por la vía metabólica el shunt de las pentosas *(270)*. Por lo tanto en este sistema de detoxificación es importante la participación de la glutation peroxidasa, la glutation reductasa y el shunt de pentosas.

La vitamina E (VE) o tocoferol forma parte del grupo de las vitaminas liposolubles y se la considera la vitamina más antioxidante de las membranas celulares *(378)*. Es uno de los primeros compuestos que se utilizó experimentalmente para prevenir la lesión de isquemia-reperfusión hepática *(272)*.

La vitamina VE es un antioxidante liposoluble y ejerce una acción protectora y eficaz sobre las moléculas PUFA, calculándose que una molécula de VE puede proteger a más de quinientas de aquellas *(273).*Su mecanismo de acción es por la enzima ciclooxigenasa, el ácido araquidónico (AA) da origen a diversas sustancias vasoactivas y generadoras de respuestas sobre otra molécula , una de ellas es la prostaglandina E_2 (PGE_2) que actúa sobre el sistema inmunológico, suprime la producción de citoquinas como la interleuquina-2 (IL-2) *(274)*, inhibe también la proliferación de linfocitos antígeno, la generación de anticuerpos y la actividad citolítica de las células T *(275)*. Interfiere además en el sistema de señales celulares, inhibiendo el flujo intracelular de calcio y la expresión del mensaje para la IL-2 *(276).*

Existe evidencia que la PGE_2 y otros productos de la cascada de la ciclooxigenasa, aumentan con el envejecimiento, y se ha observado en anciano un aumento de la inhibición proliferativa de los linfocitos ante la presencia de PGE_2 *(124)*.

La VE puede contrarrestar estas acciones ya que su función antioxidante reduce la formación de hidroperóxidos que constituyen el sustrato de la ciclooxigenasa *(125)* Otro mecanismo de acción de la VE consistiría en una protección de las membranas y componentes citoplasmáticos de las células por inhibición no-enzimática de la lipoperoxidación *(279)(277*).

Muchos son los estudios con suplementación de VE, uno de ellos, forma parte del *Heart Outcome Prevention Evaluation Study Investigators (HOPE., 2000) (280)* sobre una muestra de 2.545 mujeres y 7.000 hombres de más de 55 años de edad, con antecedentes de enfermedad cardiovascular, diabetes y otros factores de riesgo. Se les administro en forma eleatoria 400 UI de VE diaria y a otro placebo durante 4.5 años aproximadamente. No encontrándose diferencias significativas entre los grupos asignados, como tampoco, cambios sustanciales en los pacientes de alto riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares.

Sin embargo, estos resultados se contradicen con los resultados del *CHAOS* del grupo de *Cambridge (Cambridge Heart Antioxidant Study)* en una muestra de 2.000 pacientes con enfermedad coronaria comprobada por la clínica y por coronariografía, divididos en un grupo placebo y un grupo VE; éste último recibió entre 400 y 800 mg diarios de VE durante un período de un año. Comparado con el grupo placebo, el grupo que recibió VE redujo en forma significativa la incidencia de eventos cardiovasculares y altamente significativa respecto del infarto de miocardio. En relación con la incidencia de muerte por IAM, las diferencias no fueron significativas. *(281)*.

En el estudio italiano *GISSI - Prevenzione trial*, sobre una muestra de 11.324 pacientes que sobrevivieron a un reciente infarto agudo al miocardio (IAM), divididos en forma aleatoria y doble ciego en; pacientes que recibieron 1 gm/día de PUFA omega-3 (n=2.836), o VE sintética 300 mg/día (n=2.830), durante un tiempo de 3 a 5 años. Los objetivos primarios del estudio eran: muerte, IAM no fatal, y accidente cerebrovascular (ACV). Los AGP omega-3, redujeron los objetivos combinados muerte, IAM no fatal y ACV en un 10%. Cuando se comparo cada suplemento con el grupo control, los AGP omega-3 (comparados con la VE) redujeron el riesgo en un 15% y 10% respectivamente. El resultado para los AGP omega-3 fue estadísticamente significativo (p=0.023). Sin embargo en la discusión, los autores señalan que: Se observa un posible beneficio por la VE, en el análisis secundario de los objetivos individuales de muerte cardiovascular respecto a los objetivos combinados, y en este aspecto los resultados fueron similares a los AGP omega-3 *(282)*.

En otro estudio multicéntrico en que se utilizó selegilina y alfa-tocoferol sobre una muestra de 341 pacientes de *Alzheimer (EA),* con una ingesta diaria de 2000 UI de vitamina E, 2000 UI de VE y 10mg de selegilina diarias, 10 mg de selegilina diarias , y placebo. Se concluyó que el tratamiento con selegilina, vitamina E, o ambos, redujeron la aparición en el tiempo de los ítem evaluados. Los autores de este trabajo prospectivo doble ciego concluyen que el tratamiento con selegilina, VE más selegilina o VE sola fue beneficioso en retrasar los objetivos considerados: internación deterioro de las funciones cognitivas, y muerte *(283)*.

Otro estudio sobre la disfunción endotelial vasomotora por acción del alfa-tocoferol en pacientes con altos niveles de proteína remanente (n=40), con diagnóstico de insuficiencia coronaria, se les administro de manera aleatoria y doble ciego durante 4 semanas 300 UI de VE diarias y placebo. Observándose que los valores de lipoproteínas en plasma, no se modificaron con el tratamiento, pero sí subieron los de VE. Quedó en evidencia una disminución de los TBARS en los pacientes tratados, con los que recibieron placebo. Se produjo un aumento significativo de la dilatación post-hiperemia en el grupo tratado que no era afectado por los vasodilatadores endotelio-independientes. Se concluyó que los pacientes con niveles altos de lipoproteínas remanentes presentan una disfunción arterial endotelio-dependiente. La que estaría asociada a un estrés oxidativo importante, por lo que la producción de radicales libres del oxígeno tendría participación en este mecanismo. La administración de VE mejora esta disfunción y reduce el estrés oxidativo, sin modificar los niveles de las lipoproteínas *(284)*.

En un estudio sobre los efectos de reducción de la VE en la captación de LDL oxidada a través de un mecanismo de inhibición de la expresión del receptor

CD_{36} en cultivos de células musculares de aorta. Se observó que este receptor atrapador de LDL oxidada es expresado por células musculares lisas de la aorta y que la VE desregula dicha expresión. También se comprobó que mediante este mecanismo se produce una menor captación de LDL oxidada por la pared arterial. Concluyéndose que las estrategias para prevenir la arteriosclerosis se hallan orientadas a reducir el colesterol plamático o el estrés oxidativo.

La VE es un conocido antioxidante, y numerosos estudios indican que previene la arteriosclerosis. Son varios los mecanismos mediante los cuales la VE reduciría el proceso de aterogénesis. Estos son: Inhibición de la oxidación de la LDL protegiendo a los fosfolípidos de la molécula. Disminución de la proliferación de músculo liso, mediante la inhibición de la vía PKC. Prevención de la inflamación y la inhibición de los monocitos y su adhesividad al endotelio. Inhibición de la LDL oxidada por la pared arterial mediante un mecanismo de inhibición de los receptores CD_{36} *(285)*.

El uso de antioxidantes, en la prevención secundaria de complicaciones cardiovasculares de pacientes con insuficiencia renal crónica *(SPACE)* fue estudiado en un trabajo multicéntrico, doble ciego y aleatorio que se llevó a cabo durante 6 centro de hemodiálisis de Tel Aviv. La muestra fue 200 pacientes con IRC, divididos en 2 grupos, uno control y otro intervencionista que recibió 800 IU de VE en un tiempo de 2 años. Los objetivos finales del estudio fueron: Infarto de miocardio fatal y no fatal, accidente cerebrovascular isquémico, enfermedad vascular periférica y angina inestable. En los resultados no se encontraron diferencias entre los grupos respecto a antecedentes de factores de riesgo, y los niveles de laboratorio para lípidos fueron similares. Se consiguió una reducción significativa de los objetivos finales para infarto de miocardio y muerte de causa cardiaca en el grupo que recibió VE. Concluyéndose que el empleo de antioxidantes en este caso VE, previene en forma significativa la muerte de causa cardiovascular y el IAM fatal y no fatal *(286)*.

En trabajos donde se han estudiado los efectos inhibitorios de la VE, sobre la LDL oxidada que estimula la apoptosis en células endoteliales a través de la vía IkB-NFkB, se ha observado que la LDL oxidada tiene una participación activa en la injuria endotelial y la génesis de la placa ateromatosa.

Recientemente, se ha observado que la apoptosis, un marcador de arteriosclerosis es inducida por la LDL oxidada. Ésta induce apoptosis en los macrófagos y en las células endoteliales mediante la alteración de genes apoptóticos (bcl-2 y FAS) así como del factor de transcripción NF-kB. La activación de este factor depende de la degradación de una proteína llamada IkB y

se ha demostrado que la LDL oxidada activa el factor NF-kB promoviendo la degradación de IkB. En medios adecuados se cultivaron células endoteliales que fueron incubadas con LDL oxidadas durante 24 horas para determinar la degradación de IkB, la subsiguiente activación de NF-kB y como consecuencia, la inducción de apoptosis. Se prepararon cultivos controles, cultivos a los que se les agregó LDL oxidada, y cultivos con LDL oxidada y VE.

En los resultados se evidenció que el tratamiento con LDL oxidada en los cultivos produjo un aumento significativo de apoptosis respecto a los controles. Este efecto era dependiente de la concentración de LDL oxidada en el cultivo. El Western blot demostró que la LDL oxidada inducía la degradación de IkB y esto aumentaba la activación del NF-kB. Todos estos fenómenos eran inhibidos con la VE. Estos resultados agregan argumentos sobre el potencial beneficio de la VE en la enfermedad coronaria isquémica *(287)*.

Varias líneas de investigación, sugieren que las citoquinas proinflamatorias IL-1 beta, es proaterogénica, posee actividad procoagulante, estimula la adhesión de los monocitos al endotelio y a la proliferación del músculo liso por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La LDL oxidada, aumenta la IL-1 beta y esto se correlaciona con la severidad de la arteriosclerosis.

En un estudio sobre el alfa-tocoferol y sus efectos en la disminución de la liberación de IL- beta de los monocitos humanos activados, mediante la inhibición de la 5-lipooxigenasa se observó: una inhibición de la IL-1 beta y de la actividad de la proteína quinasa C, por parte de la VE. Considerando que la VE podría prevenir la liberación de la IL-B1 a través de un atrapamiento de radicales libres, se agregó catalasa y superóxido dismutasa a los monocitos, pero no se observó una reducción significativa de IL-1B. La VE disminuyó en forma significativa la liberación de LTB4 por parte de los monocitos activados. Utilizando inhibidores específico de la 5-lipooxigenasa, los autores además encontraron que el mecanismo de inhibición de la IL- beta se efectuaba a través de la inhibición de la 5- lipooxigenasa. Concluyéndose, hasta la aparición de este artículo, que los efectos biológicos de la VE que le conferían poder antiaterogénico, eran mediados por una protección directa sobre la LDL y por inhibición de la proteína quinasa C.

En este trabajo, los autores incorporan un nuevo mecanismo antiaterogénico de la VE que tiene relación con la inhibición de la producción del factor proinflamatorio y proaterogénico IL-1 beta de los monocitos por inhibición de la 5- lipooxigenasa. Por lo tanto, la VE, además de proteger la oxidación de la LDL, posee acción inhibidora sobre importantes enzimas proaterogénicas como la proteína quinasa C y la 5- lipooxigenasa *(288)*.

La vitamina C (VC) es una sustancia hidrosoluble, que posee tanto, propiedades antioxidantes como oxidantes, según la cantidad de hierro tisular *(289)*. En presencia de bajas concentraciones, la VC ejerce una acción antioxidante, uniéndose al radical superóxido o hidroxilo y formando el radical semidihidroascorbato, que posteriormente es reducido por GSH *(300)*. También por otro lado la VC, suprime la inactivación de las proteasas provocada por el sistema de *Klebanoff (301)*. En altas concentraciones de hierro, la VC es capaz de catalizar la reacción de Fenton, generando hierro ferroso y radical hidroxilo *(302)*.

La administración crónica de ácido ascórbico (AA) ha demostrado revertir la disfunción vasomotora endotelial en pacientes con enfermedad coronaria. En un estudio aleatorio doble ciego, con placebo versus tratamiento de 2 gr. de AA seguida de 500 mg/día, durante un período de 30 días, en 46 pacientes con enfermedad coronaria comprobada. Se concluyó que, en los pacientes con enfermedad coronaria, el tratamiento prolongado con AA produce un beneficio sobre la relajación óxido nítrico-dependiente. Teniendo en cuenta que la disfunción endotelial puede contribuir a la patogénesis de eventos cardiovasculares, se sugiere que el tratamiento con AA puede beneficiar a los pacientes con este tipo de enfermedad *(303)*.

Existen varias experiencias en humanos que demuestran la presencia de una disfunción endotelial en los sujetos fumadores. También es sabido que estas personas tienen niveles plasmáticos bajos de VC y que la administración de la misma mejora dicha disfunción endotelial produciendo vasodilatación y aumento del flujo. Asimismo, se ha observado que la VC mejora el flujo epicárdico en pacientes con patología coronaria.

En un estudio cuyo objetivo era conocer los efectos de la VC en la restitución de la microcirculación coronaria en 8 participantes no fumadores, de una edad promedio de 42 años y 11 fumadores crónicos sin patologías asociadas ni otros factores de riesgo que no sean el tabaquismo. Se demostró, el efecto nocivo prooxidante del tabaco que se extiende más allá de las arterias epicárdicas, involucrando la microcirculación coronaria. Tanto el flujo sanguíneo al miocardio como la reserva de flujo coronario pueden ser normalizados con la administración de VC. Esta experiencia asimismo demuestra que el efecto nocivo de la nicotina es fundamentalmente a través de la altísima producción de radicales libres fundamentalmente radical hidroxilo proveniente de las quinonas y a una producción directa de anión superóxido *(304)*. No obstante, a que con VC no se han realizado estudios epidemiológicos a gran escala, pero sí en pequeños grupos de individuos con factores de riesgo. Se observó que la administración oral durante un mes o intraarterial de VC produce una mejoría del flujo arterial en pacientes dislipidémicos *(305)*, en insuficiencia cardíaca *(306)*, y con enfermedad coronaria *(307)*.

Existen tres estudios que evalúan la modificación en la presión arterial con la administración de VC. Uno de ellos incorporó a 38 individuos hipertensos que durante 8 semanas fueron asignados a recibir placebo o 200 mg de sulfato de zinc, 500 mg de VC, 600 mg de VE, y 30 mg de beta caroteno. Se produjo un descenso de la presión arterial sistólica en el grupo tratado *(308*).

El segundo estudio incorporó a 39 individuos hipertensos que fueron divididos en un grupo que recibió una dosis inicial de VC de 2 gr y luego durante 30 días 500 mg/día. El grupo tratamiento redujo en forma significativa los valores de presión arterial sistólica comparado con el grupo placebo *(309)*.

El tercer estudio, enroló a 40 sujetos masculinos hipertensos que recibieron durante 3 meses 500 mg diarios de VC o placebo. Se produjo en el grupo tratado una disminución moderada pero significativa de la presión sistólica *(310*). Concluyéndose que en los tres estudios se consiguió una reducción significativa de la presión arterial sistólica y en dos de ellos la presión arterial media, sin que se viera afectada la diastólica.

Los beta-carotenos también han sido utilizados en numerosos estudios. *El Physicians Health Study*, tenía por objetivo conocer los efectos de diferentes antioxidantes y su relación con la patología cardiovascular. El estudio se llevó a cabo sobre una muestra de 22.000 personas divididas en diferentes grupos; placebo, beta-caroteno (50 mg día por medio), aspirina, y beta-caroteno más aspirina durante un tiempo de 13 años. Se observó que la aspirina produjo una reducción del 44% en la aparición de infarto de miocardio. El beta-caroteno no produjo modificación alguna en lo concerniente a enfermedades cardiovasculares o neoplasias *(311)*.

Similares fueron los resultados encontrados en 15.000 fumadores crónicos con antecedentes de asbestosis. Los que fueron asignados en los siguientes grupos; placebo, beta-caroteno (30mg) y 25.000 UI de vitamina A/día. En el grupo de beta-caroteno la incidencia de cáncer de pulmón aumentó en un 28%. Descalificándose el uso de beta-caroteno, al menos a dosis altas y en individuos fumadores *(312)*.

También en otro estudio de 6 años de duración y sobre una población de 29.133 fumadores crónicos en Finlandia. Los participantes fueron asignados en grupo placebo, VE (50mg/dia), beta-caroteno (20mg/día) y beta-caroteno más VE. Quedó en evidencia que el grupo que recibió beta-caroteno aumentó en un 18% la incidencia de cáncer con significación estadística. La VE no influenció en el cáncer de pulmón pero redujo el cáncer de próstata *(313)*. Sin embargo, en un estudio intervencionista de 5 años relacionado con el cáncer de estómago y esófago en China, en 30.000 adultos divididos en diferente grupos de suplementación; grupo vitamina A y zinc, grupo riboflavina y niacina, grupo VC

y molibdeno, grupo VE (60 mg/día), beta-caroteno (15 mg/día), selenio (50 ug/día). Se logró en este último grupo reducir en un 21% la incidencia de cáncer de estómago. Concluyéndose, que posiblemente en este lugar geográfico existía un déficit de alguna o de las tres sustancias que se constituían en un factor cancerígeno. Por lo tanto no se pudo establecer cual de las tres sustancias antioxidantes fue la responsable de la reducción del cáncer de estómago. *(314).*

No obstante, el estudio cooperativo denominado *MONICA (Monitory Cardiovascular Diseases) (315)* en que participaron dieciséis países de Europa, sobre una muestra de cien mil personas seleccionadas aleatoriamente a las que se le efectuaron determinaciones de VE, VC y beta-caroteno. Se encontró una correlación significativa entre el bajo nivel de VE y enfermedad coronaria, siendo menor esta correlación con la VC e insignificante con el beta-caroteno. Este factor de riesgo fue más importante que la hipertensión arterial y el tabaquismo. Dejando en evidencia que hay un alto riesgo de enfermedad cardiovascular si los niveles de VE son bajos. Los países nórdicos son los que presentan una mayor mortalidad (600 personas por cada cien mil habitantes). España y específicamente Barcelona observan una mortalidad de solo 200 personas para la misma proporción y los niveles de antioxidantes más altos en comparación a los finlandeses.

Se ha demostrado también que la presencia de N-acetilcisteína (NAC) en altas concentraciones protege a las células del daño oxidativo *(316).* El NAC es un derivado tiólico, importante para la síntesis de glutation en numerosos tejidos. Su efecto protector es atribuible a dos razones: el primero, a su efecto antioxidante al neutralizar el H_2O_2, y el segundo aumentando las reservas citoplasmáticas de glutation *(317).*

Se conoce el efecto protector del NAC en situaciones de fallo hepático en el modelo de isquemia reperfusión, postulándose su posible uso clínico en cirugía hepática y durante el trasplante hepático *(318).*

La coenzima Q_{10} (CoQ_{10}) es otro antioxidante y es transportada en la circulación sanguínea en un 60% por el LDL y menos del 30% por el HDL_2, en ausencia de un aporte exógeno, los tejidos están capacitados para sintetizarla. Esta CoQ_{10} endógena no se transporta ni redistribuye en el organismo como la de origen exógeno. Se encuentra en la dieta normal, la carne y las aves son las principales fuentes de su previsión, en el ser humano la síntesis endógena parece ser la más importante *(319).*Se forma como un producto terminal de la vía del mevalonato, sustancia presente en todos los tejidos de organismos superiores *(320).*

La CoQ_{10} principalmente en su forma reducida ubiquinol es transportada por las lipoproteínas en la circulación, comportándose como agente antioxidante, al reducir el nivel de ácidos grasos transportados en las lipoproteínas *(321)*. Al oxidarse el ubiquinol se convierte en ubiquinona, siendo el primer antioxidante que se consume cuando el plasma es sometido a un estrés oxidativo in vitro *(322)*, previniendo la iniciación y la propagación de la peroxidación lipídica en el plasma, en las lipoproteínas de membrana y adicionalmente a la oxidación de las bases nucleicas del ADN *(323)*.

Sus concentraciones tisulares varían sustancialmente entre los distintos órganos; las mismas parecen ser mayores en tejidos aeróbicos con alto metabolismo, y por lo tanto, con mayor capacidad de producir radicales libres *(324)*. Se sitúa en la cadena respiratoria mitocondrial, donde actúa como un transportador de electrones entre el NADH y la succinato dehidrogenasa y el sistema de citocromo, postulándose que la CoQ_{10} facilita un ciclo de protones dentro de la membrana mitocondrial *(325)*. Actuando durante el ciclo de óxido-reducción como agente de transferencia de protones.

La producción de un gradiente de protones transmembrana es la base para captar energía y formar ATP o gradientes iónicos, siendo muy importante para la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa. *(326).Yokoyama (1996) (327),* en un estudio aislado con ratas, investigó la acción antioxidante de la CoQ_{10} en la hiperactividad coronaria de la isquemia-reperfusión. Observando que su administración, prevenía la disfunción del endotelio, como también el nivel de radicales libres durante los primeros momentos de la reperfusión.

En un modelo canino de isquemia cardíaca con tratamiento previo de CoQ_{10} se observó una disminución del daño por reperfusión y la producción de malondialdehido *(328)*. La administración de CoQ_{10} en conejos también demostró mejorar la capacidad de producir ATP, manteniéndose los niveles de estos fosfatos durante el fenómeno de isquemia-reperfusión *(329)* Ya que la CoQ_{10} es un transportador de electrones entre las flavina coenzimas y el citocromo b en la membrana interna mitocondrial durante la fosforilación oxidativa.

En otro estudio más recientes sobre un modelo de corazón aislado, se evidenciaron los siguientes resultados del pre-tratamiento con CoQ_{10}: se mejoró la función diastolica durante la reperfusión, se mantuvieron los niveles elevados de ATP, se preservó la vasodilatación coronaria producida por el nitroprusiato de sodio y aumentó el flujo coronario *(330)*.

También se ha demostrado la acción protectora de la CoQ_{10} sobre el miocardio en un modelo porcino *(331)*. En cambio, cuando se utilizó como modelo el corazón de conejo, no se produjo reducción del área infartada, pese a la administración endovenosa de CoQ_{10} realizada tanto antes como después de la oclusión coronaria *(332)*. *Judy y col (1993)(333)*, monitorearon el ATP miocárdico y hallaron mayores niveles en el grupo que recibió la CoQ_{10}, tanto después del enfriamiento cardíaco como después de la reperfusión. También se ha observado niveles significativamente menores de CK y CKMB, ambos marcadores de daño miocárdico, fueron detectados en dos o tres estudios realizados sobre pacientes sometidos a cirugía cardíaca y que recibieron CoQ_{10} *(334)*

2.8. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS.

Los episodios agudos de actividad física o de ejercicio intensos repetidos se asocian a un incremento de la gravedad de ciertas infecciones víricas y parasitarias *(367)(378)(405)*. Hace ya bastante tiempo que la practica del ejercicio físico intenso durante el transcurso de una infección se ha asociado a un aumento de la gravedad de ésta y a parálisis por poliomielitis en seres humanos *(357)* y en modelos animales experimentales *(381)(382)*. Además se ha comunicado que la práctica de ejercicio físico después de una infección está asociada a una susceptibilidad a la enfermedad *(383)(384)*.

Sin embargo, el entrenamiento moderado antes una infección inducida experimentalmente parece conferir resistencia a ciertas infecciones *(385)(386)*. Por lo tanto, al parecer el ejercicio afecta de manera diferencial la inmunidad y la susceptibilidad a la infección dependiendo de su nivel de intensidad o de estrés, para elevar la respuesta inmune.

Otra complicación es la relacionada con la respuesta bifásica del sistema inmunitario al estrés: en algunos sistemas se produce una inmunosupresión inicial seguida al cabo de algunos días, por una elevación de la inmunidad *(387)*. Las modificaciones en los parámetros inmunológicos han sido estudiadas por muchos autores *(388)(389)*. Durante una actividad física prolongada e intensa el número de linfocitos circulantes aumenta significativamente, modificando algunos de ellos su actividad *(390)*.

Los linfocitos CD4 aumentan durante el proceso infeccioso pero no durante la actividad deportiva, observándose un ligero descenso y un aumento de las células NK circulantes *(391)*. No obstante, los linfocitos CD8 aumentan en ambos casos determinando una disminución del cociente CD4/CD8 *(390)*. La fagocitosis es un mecanismo de defensa constituida por aumento de los leucocitos polimorfonucleares y por los macrófagos *(392)*. Tanto tras la penetración de un

microorganismo y su multiplicación en el organismo, como respuesta a una actividad física intensa y duradera, se produce aumento de fagocitos circulantes *(393)*.

En el caso de una infección las razones son claras pero tras el ejercicio enérgico, los motivos aducidos pueden ser varios; la movilización de los depósitos de los fagocitos con el ejercicio, la movilización de los fagocitos orgánicos que penetran en la circulación mayor, como el aumento de la circulación, la posible hemoconcentración que se produce tras un esfuerzo prolongado, la respuesta a los tejidos destruidos, restos celulares que pueden entrar en el torrente circulatorio *(392)*.

Sin embargo, cuando se ha estudiado la actividad fagocitaria tras un esfuerzo físico intenso, prolongado o suave en animales de experimentación, la activación fagocitaria no se produce como en el caso de una infección *(393)*. No se produce una mayor actividad en la quimiotaxis, diapedesis, fagocitosis, ni bacteriolisis *(392)*

Paralelamente también se ha confirmado una inmunosupresión de la inmunidad celular observándose un aumento de interleuquina-1 (IL-1) del factor de necrosis tumoral (TNF) como también de los interferones, inmediatamente tras el esfuerzo físico *(459)*. Esto debido al parecer a la liberación de catabolítos, a la penetración de partículas de células a la sangre, y fundamentalmente a células musculares destruidas *(419*.

Ya que el trabajo excéntrico realizado a intensidades máximas evidencian tanto durante o al término del ejercicio un aumento muscular y plasmático de citoquinas (IL-1,TNF y IL-6) que están involucradas en la respuesta inflamatoria del daño muscular *(394)(396)*. Las que han sido observadas tras las micrografías electrónicas que muestran una desorganización de las proteínas contráctiles dentro de las fibras agota *(398)*.

Se ha observado en situación de reposo en maratonianos de nivel medio con intensos programas de entrenamiento recuentos de linfocitos inferiores a la normalidad *(399)*. Sugiriendo la posibilidad de que el entrenamiento intenso altere el número de linfocitos. Se ha observado que la leucocitosis se inicia al cabo de pocos minutos de iniciar el ejercicio y aumenta con el incremento de las cargas de trabajo *(400)* disminuyendo a los diez minutos de haber terminado el ejercicio y retornando a los niveles basales transcurridos los treinta minutos, para luego incrementarse nuevamente, a las dos horas después del ejercicio máximo *(401)*. Al cabo de las 24 horas desde el término del ejercicio se registra el retorno a la normalidad del recuento de leucocitos *(400)*.

No obstante, en otros estudios no se han comprobado leucocitosis inducida por el ejercicio *(402)*. Lo que puede ser explicado por las diferentes intensidades de los ejercicios y los diferentes niveles de preparación de los individuos. Pero sí se han descrito una leucocitosis significativa en individuos no entrenados durante una carrera máxima más corta *(403)*. Tanto el ejercicio máximo en individuos entrenados o no como en el ejercicio submáximo en individuos no entrenados provoca leucocitosis *(404),* mientras que el ejercicio submáximo en individuos entrenados no ocasiona el mismo efecto *(405)*.

El grado de leucocitosis puede estar relacionado con las diferencias de los niveles de catecolamina registrado durante el ejercicio, puesto que las catecolaminas inducen a una rápida leucocitosis *(403)*. El incremento inducido por el ejercicio del recuento leucocitario se debe a aumentos de la cantidad de granulocitos y linfocitos, aunque no siempre ambas poblaciones experimentan idénticos crecimientos *(405)*.Se ha sugerido que la magnitud de la leucocitosis puede ser inversamente proporcional al nivel de entrenamiento previo *(403*)

También se ha observado después del ejercicio una linfocitosis *(406)*. No obstante, se ha comunicado la ausencia de cambios en el recuento de linfocitos registrados después de una maratón *(407)*. Estos resultados tan dispares pueden ser atribuibles a la variación individual de la respuesta hormonal al ejercicio, ya que, la variación individual del cortisol, de las catecolaminas, y los péptidos opiáceos, pueden actuar como potentes inmunorreguladores *(408)*. El recuento de linfocitos comienza a disminuir al cabo de 10 minutos desde el término del ejercicio, y vuelve a los niveles básales aproximadamente a los cuarenta y cinco minutos, con independencia de la duración o la intensidad del ejercicio *(409)*.

Sin embargo, también se ha observado que el grado de linfocitosis es susceptible a cambiar con el entrenamiento *(410)*. Lo que puede guardar relación con un incremento menor, como resultado del entrenamiento, de los niveles de catecolaminas durante el ejercicio *(408)*. Los cambios inducidos por el ejercicio en la linfocitosis en sujetos entrenados o no entrenados es el aumento del número de las células B, con cambios menores o nulos de las células T, siendo su magnitud mayor en los sujetos no entrenados *(411)*.

Se ha observado un incremento del número de células T cooperadoras y supresoras después del ejercicio, registrándose una respuesta mayor en las T supresoras *(409)*. El descenso entre la proporción de estas células guarda una correlación inversa con el incremento de la adrenalina plasmática, aunque no con las modificaciones de los niveles de cortisol. *(408)*. Algunos tipos de linfocitos son capaces de desarrollar una actividad citotóxica uno de ellos es, la citotoxidad de mediación celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y la otra es, las células asesinas naturales (NK) las que pueden ser activadas por el interferón (IFN). En el

ejercicio se incrementa tanto la CCDA, como la actividad de las NK *(412*). También se ha observado un incremento de las células NK después de un ejercicio moderado o máximo breve.

Se ha sugerido que el INF y el ejercicio pueden incrementar la actividad NK *(413*). Los niveles de INF se incrementan después del ejercicio. El ejercicio moderado no ocasionaría al parecer una estimulación máxima de la actividad NK *(412)*. La interleuquina 1(IL-1), aumenta la estimulación inducida por el INF de la actividad NK *(414)*. El ejercicio también incrementa los niveles de IL-1 *(415)* y es posible que su efecto esté mediada por la estimulación de la IL-2 por las células T, ya que ésta eleva la actividad NK *(416)*.

Se ha descrito que la liberación de IL-1 regula un gran número de reacciones. Se considera que ejerce un efecto protector sobre un organismo infectado estimulando la producción de linfocitos, inmunoglobulinas e incrementando la síntesis de IL-2 *(417)*. Varias modificaciones se observan en las IL-1 después del ejercicio, como el aumento de la temperatura corporal, la liberación de neutrófilos *(418)*, la liberación de proteínas de fase aguda *(414),*el incremento de la actividad y del número de células NK *(416)* linfocitosis *(409)* la oxidación de aminoácidos del músculo esquelético *(410)* y el sueño de onda lenta.

Los niveles en reposo de inmunoglobulinas séricas (IgA, IgG, IgM) son normales en los atletas que efectúan entrenamiento de resistencia *(420)* y no se modifican después del ejercicio moderado en individuos entrenados o no entrenados *(421)*. Se ha podido observar que la producción de la IgG en atletas que se les inyectó toxoide tetánico 30 minutos después de un maratón, fue significativamente superior que los controles sedentarios. Sugiriéndose que es posible que la respuesta de anticuerpos específica se incremente después del ejercicio *(420)*.

Sin embargo, en ratas sometidas a esfuerzo físico después de la inyección se observó un retraso o la abolición de la respuesta de anticuerpos séricos *(422)*. En animales sometidas a un ejercicio de natación después de una infección con virus coxsackie B3 no se hallaron en suero anticuerpos neutralizantes entre tres y cuarenta días después de la infección. Pareciendo ser que éstos resultados pueden ser más atribuible a una respuesta por parte de animales enfermo en una situación estresante como es su supervivencia que, a una respuesta real al ejercicio.

Los microorganismos al invadir superficies de mucosas se encuentran con la primera barrera defensiva que la constituye el sistema inmunitario secretor de los tejidos *(421)*. La IgA es la clase predominante de anticuerpos en las secreciones, y

se ha demostrado que inhibe la fijación de varias clases de microorganismos patógenos, la que guarda relación con la resistencia a la enfermedad respiratoria *(423)*

En atletas de deportes de invierno se registraron unos niveles en reposo de IgA salival inferiores a los de controles comparados por edad, con una disminución adicional después de un ejercicio intenso prolongado. *(424)* Sugiriéndose que en este tipo de deportes la disminución de IgA salival podría deberse a una pérdida de fluido nasal, a cambios en el transporte de las células secretoras de inmunoglobulinas de mucosa o a la síntesis local de inmunoglobulina durante la competición, pudiendo deberse estas modificaciones al estrés de la competición, el agotamiento físico, la exposición prolongada al aire frío o una combinación de factores*(425)*.

En ciclistas sometidos a un esfuerzo máximo se observó una disminución de la IgA, como también de los niveles salivales de la IgM. Manteniéndose ambos niveles bajos durante 24 horas después del ejercicio, para luego volver a los valores pre-ejercicio. El ejercicio intenso no modificó los niveles de IgG, indicando un efecto específico sobre las inmunoglobulinas secretoras *(426)*. Por lo tanto, su depleción aumentaría la susceptibilidad a las infecciones respiratorias durante las primeras horas después de un ejercicio intenso de resistencia.

Varias hormonas, neurotransmisores, y moléculas metabólicamente activas que también son inmunomoduladoras son modificadas sus niveles por el ejercicio físico. Entre estas sustancias se encuentran los corticoides, catecolaminas y péptidos opiáceos. También es posible la intervención de otras hormonas, como el factor de liberación de la corticotropina (CRF), la hormona adrenocorticotropina (ACTH), la hormona del crecimiento, la prolactina y las hormonas sexuales *(427)*.

Los niveles plasmáticos de cortisol aumentan durante el ejercicio y su incremento y retorno a niveles basales dependen de la intensidad y la duración del ejercicio *(428)*. Tanto en el ejercicio intenso como moderado el cortisol plamático permanece elevado hasta aproximadamente 90 minutos después del término del ejercicio *(429)*. Sin embargo, el cortisol es un supresor de algunos parámetros inmunitarios, sobre todo del número y de la función de los linfocitos *(454)*

No obstante, se ha observado después de una carrera de 35 km en atletas, la duplicación de los niveles plasmáticos de cortisol, acompañada de leucocitisis, granulocitosis y linfocitosis *(450*) Además el aumento del cortisol y el recuento leucocitario después de la carrera también se ha observado una correlación negativa con el volumen de entrenamiento semanal *(429)*. Por lo tanto, se deduce

que cuanto mejor es el entrenamiento del atleta menor es la elevación sérica de cortisol y la leucocitosis inducida por el ejercicio. Pareciera ser que los efectos del cortisol sobre los linfocitos son diferentes después del ejercicio, en comparación al reposo, o que su acción es contrarrestada por otros factores durante el ejercicio.

Es posible que otras moléculas inmunorreguladoras liberadas durante el ejercicio, como catecolaminas y péptidos opiáceos, también contrarresten la supresión inducida por los corticoides *(454).* Aunque los incrementos de cortisol pueden estimular una granulocitosis durante el ejercicio, la alteración de los recuentos leucocitarios y linfocitarios tienen más relación con los niveles plasmáticos de catecolaminas que con los de cortisol *(450),* actuando este último mas bien, amortiguando los incrementos adicionales del recuento linfocitario.

También los niveles de catecolaminas plamática aumentan con la intensidad del ejercicio. Las concentraciones de noradrelina aumentan con mayor rapidez que los de la adrenalina y son superiores después de un ejercicio de corta duración *(405).* En cambio en los ejercicios de larga duración los niveles de adrenalina aumentan más lentamente *(451).*Ambas hormonas alcanzan los niveles más altos al término del ejercicio volviendo a los valores basales de pre-ejercicio entre los 10 y 20 minutos en los ejercicios de corta duración y a los 30 minutos en los de larga duración *(453).*

La respuesta linfocitaria al ejercicio y posterior a él, tiene una estrecha relación con la respuesta de las catecolaminas ya que los linfocitos poseen receptores beta-adrenérgicos (459). Existen diversos tipos de pruebas y estudios que confirman que la adrenalina induce modificaciones en el recuento y en las subpoblaciones de leucocitos y linfocitos observadas durante el ejercicio y después de éste *(455).* También en muchos estudios se ha confirmado que después del entrenamiento los linfocitos son menos sensibles a la estimulación inducida por las catecolaminas, probablemente a causa de una contraregulación de sus receptores por una exposición repetida a las catecolaminas durante el entrenamiento (456).

Los niveles plasmáticos de β-endorfinas (B-EF) y metencefalina también aumentan al cabo de pocos minutos de iniciado el ejercicio, volviendo a sus niveles básales 30 minutos después de terminado el ejercicio submáximo *(457).* Su incremento está condicionada probablemente a la intensidad y duración del esfuerzo, pudiendo reflejar también la influencia de otros factores liberados durante la realización de éste, como las catecolaminas, ACTH y corticoides *(458).*

Los péptidos opiáceos modulan diversos parámetros inmunitarios, como la actividad NK *(457),* la CCDA *(450),* el desplazamiento leucocitario *(456)* y la respuesta proliferativa linfocitaria a la estimulación mitogénica *(459).* Los linfocitos presentan receptores para estas moléculas, ya sean receptores opiáceos y, no opiáceos *(458).* La inmunorreactividad -β-EF/β-LT (β-lipotropina) se ha visto que se eleva en el suero después de un ejercicio de resistencia y el agotamiento *(452).* No obstante, estos péptidos no aumentan de igual manera en todos los individuos y en todas las condiciones del ejercicio *(456).*

Pareciendo haber también diferencia entre sexos, evidenciándose en los varones no entrenados un mayor incremento de β-EF que en las mujeres no entrenadas. Los niveles plasmáticos de β-EF, ACTH, y catecolaminas aumentan de manera proporcional con el ejercicio, siendo sus niveles de retorno similar post-ejercicio *(459).* La β-EF y la metencefalina estimulan el movimiento de leucocitos in vivo e in vitro, en esta última condición los monocitos y los neutrófilos también aumentan, pero no resultan afectadas las células adherentes *(450)*

Es posible que los péptidos opiáceos como factores quimiotácticos, puedan iniciar el movimiento leucocitario durante el ejercicio, pero al parecer no estimulan el movimiento linfocitario al menos en ausencia de monocitos *(430).* Es posible que los efectos de los péptidos opiáceos sobre el sistema inmunitario puede, en ocasiones, contrarrestar la inmunosupresión inducida por los corticoides *(459).*

Al parecer existe una relación bidireccional entre los sistemas neuroendocrinos e inmunitarios *(460),* esta relación parece ser establecida por los neuropéptidos y por las conexiones adrenérgicas entre el sistema nervioso simpático y los órganos linfoide, incluyendo al bazo, los ganglios linfáticos, el timo y el tejido linfoide asociado al intestino *(459).* El sistema nervioso simpático es activado durante el ejercicio y es posible que puede modificar los parámetros inmunitarios directamente a través de sus vías nerviosas hacia los órganos linfoides *(460).*

2.9. MANEJO Y PREVENCIÓN DE LA FATIGA:

2.9.1. Antioxidantes

Si bien es cierto la relación antioxidante y rendimiento es aún muy controvertido lo que menos se discute son los efectos de protección de los

antioxidantes a los daños oxidativos inducidos por el ejercicio, en particular a largo plazo, por la abundante información que hoy en día existe al respecto *(335)*.

En estudios con animales los efectos de la suplementación con VE durante períodos de ejercicio han tenido resultados contradictorios en la prevención del daño oxidativo. Pero generalmente muchos resultados demuestran los beneficios de su suplementación antes el daño oxidativo al incrementarse los sistemas antioxidantes naturales con la VE *(362)*.

La administración de VE a ratas sometidas a esfuerzos físicos sobre el treadmill, no ha mostrado aumento del rendimiento respecto a las ratas de los grupos controles *(357)*. No obstante, otros autores afirman que el uso de antioxidante determina un retraso de la fatiga muscular reduciendo el estrés oxidativo y mejorando el rendimiento *(363)* En humanos la suplementación de 600 mg de alfa-tocoferol tres veces por día durante dos semanas, han dejado en evidencia una menor cantidad de pentano exhalado en un ejercicio de un 75% del VO2max.*(364)*.

La suplementación con VE al parecer tiene un efecto protector contra el daño oxidativo inducido por el ejercicio a nivel de diferente tejidos *(365)*.Pero la administración de antioxidantes para mejorar el rendimiento físico no está bien aclarada, ya que en sujetos sometidos a esfuerzos extenuantes con suplementación de VE no observaron diferencia en su potencia aeróbica máxima o en el tiempo de mantener el ejercicio *(366)*.

Tampoco se han observado mejorías en las marcas de deportistas entrenados con suplementación de VE *(367)*. Pero sí, en montañeros los que evidenciaron una mejoría de su rendimiento y una disminución del pentano exhalado en comparación a los controles que no tomaban VE. *(368)* investigaron el efecto oxidativo del ejercicio extenuante de contracciones excéntrico-concéntrico en sujetos fumadores sedentarios. Se les administro una dosis de 400 mg/día de VE por un período de 28 días. Los niveles en plasma de TBARS post-ejercicio observaron un incremento significativo en el grupo control y experimental. Sin embargo, cuando los niveles TBARS post-ejercicio se ajustaron según los cambios del volumen plasmático, los incremento significativo desaparecieron en los dos grupos, aunque los fumadores sedentarios como era de esperar se mostraron más susceptible a la oxidación.

La administración de VC puede actuar tanto como antioxidante o como prooxidante, al reducir el ion férrico a ferroso, pudiendo luego catalizar la reacción de Fenton para iniciar la producción de HO-. y la peroxidación lipídica *(Packer L.,1999(189)*.Lo que determina que el resultado de dicha suplementación no es predecible.

En un estudio experimental sobre una muestra de cobayos con ejercicio físico extenuante y suplementación de VC de 4g/kg por dieta comparado a 2g/kg en los controles, se observó, una marcada reducción de varias enzimas mitocondriales en los animales suplementados con VC comparados con los controles. Sugiriendo esto resultados, un efecto prooxidante del escorbato *(352)*.La suplementación con VC tampoco protegió de la hemólisis causada por la deficiencia de VE *(350)*. La administración de VC, VE o de glutatión, protege contra los efectos dañinos de los radicales libres en el ejercicio físico tanto en ratas como en seres humanos *(369)*.

La suplementación con antioxidante hoy en día es de gran interés, ya que se sabe, que el ejercicio físico y en particular en los sujetos sedentarios, determina un daño oxidativo real, siendo de mucha importancia no solo para prevenirlo sino también para aumentar el rendimiento de los deportistas.

Existen estudios in vitro, que concluyen que la adición de antioxidantes mejora el rendimiento muscular reduciendo el estrés oxidativo inducido por el ejercicio *(207*). Sin embargo, la relación antioxidante y ejercicio físico es controvertida *(352)* El apoyo al status antioxidante puede aumentar la resistencia muscular a la fatiga.

El tratamiento in vitro de diafragma de rata, con 10mM del antioxidante N-acetil cisteína (NAC) que aumenta los niveles de glutation *(371)* retardó el desarrollo de estrés observado en los haces musculares controles sometidos a 10 minutos de contracciones intermitentes a 30-40 Hz *(372)*.El tratamiento con NAC en seres humanos atenuó en forma marcada el aumento de GSSG en sangre inducido por el ejercicio *(356)*. También se ha informado que el tratamiento de animales con NAC provoca un aumento de los niveles de glutation y mejora el rendimiento muscular in situ.

En sujetos voluntarios que se les administro 150 mg/kg de NAC, evidenciaron una mejor tolerancia a la fatiga que a quienes se les suministró 5% de glucosa endovenosa como placebo. La estimulación tetánica, a 10 Hz o 40 Hz durante 30 minutos en el tibial anterior, mostró una mejoría de la contracción en un 15% con tratamiento previo de NAC. No se observó esta respuesta con NAC a 40 Hz *(335)*.

También se ha demostrado el efecto protector de la coenzima Q_{10} (CoQ) contra el estrés oxidativo causado por los radicales libres. En su forma reducida es considerada un antioxidante per se o por su capacidad de reciclar la VE13 *(325)*. En un estudio en ratas con suplementación de CoQ y sometidas a un ejercicio físico de descenso sobre una superficie inclinada se observó una menor presencia de creatina kinasa y lactato dehidrogenasa *(303*).

Pero no fueron observados los mismos resultados en seres humanos sometidos a una prueba de esfuerzo físico extenuante sobre el cicloergómetro *(213)*. En secciones de tejido de animales suplementados con CoQ, mostraron ser más resistente a la peroxidación lipídica inducida por el hidroperóxido de tertbutilo que las de tejidos de animales sin suplementación de CoQ *(214)*.

La interferencia del ejercicio físico y de la infección en la respuesta defensiva del individuo son múltiples y muchas veces contradictorias. Nuestro organismo como el de los animales poseen determinados mecanismos defensivos contra los agentes patógenos. En primer lugar están las barreras naturales como son, la piel, las mucosas, las secreciones y la flora microbiana y en segundo lugar los mecanismos inespecíficos como es; la fagocitosis, s. complemento, etc., y específicos como; la inmunidad humoral y celular.

2.9.2. Inmunomoduladores

El término inmunomodulador comprende a un amplio grupo de productos y sustancias con diferentes actividades y efectos sobre la funcionalidad del sistema inmunológico, que en la mayoría de los casos no queda claramente especificada.

El uso de inmunomoduladores abre nuevas perspectivas para la corrección de distintas patologías que comparten como proceso fisiopatológico común: la disfunción del sistema inmune con aumentos de citoquinas proinflamatorias.

La denominación de calaguala se ha aplicado tradicionalmente en America Central y Sudamérica a un elevado número de Polipodiáceas estrechamente relacionadas entre sí. Algunos de estos helechos, como el *Polypodium leucotomos*, son utilizados actualmente como productos farmacéuticos (Difur) para el tratamiento de patologías relacionadas con alteraciones del sistema inmune (psoriasis, vitóligo, etc.).

La definición específica de estas plantas proviene del acuerdo unánime al que se llegó en el año 1992 sobre su nomenclatura y clasificación taxonómica. Este acuerdo se llevó a cabo por especialistas de la Escuela Agrícola Panamericana de Honduras, por la Universidad de Uppsala de Suecia y por la Universidad Nacional Autónoma de Honduras. La relación entre las variedades de calaguala, y específicamente del género *Polypodium* es la siguiente:

Género Polypodium

↓

Subgénero Phlebodium

Polypodium aureum — Polypodium decumanum

(Polypodium leucotomos) — **(Phlebodium decumanum)**

Las plantas cultivadas en la plantación del lago Yojoa en Hondura, caracterizada por un ancho y extenso fronde provisto de varios soros (3 a 7) y por su grueso, carnoso y velloso rizoma, debe considerarse como ***Phlebodium decumanum*** (PD) reservándose la nomenclatura Polypodium leucotomos para la variedad de fronde más corto y estrecho con un único soro. En la plantación del lago Yojoa es la única en el mundo donde se cultivan estas dos polipodíaceas, constituyendo un buen ejemplo de cultivos procesados orgánicamente y una importante contribución a la conservación de la biodiversidad.

Todas las formulaciones a base de *Phlebodium decumanum* se obtiene a partir de una fracción hidrosoluble de fronde, purificada y estandarizada. Esta fracción a la que le asignó el código interno de EXPLY-37, convertido posteriormente en marca internacional registrada, es obtiene por extracción hidroalcohólica de los frondes maduros, secos y triturados, seguida de la eliminación del disolvente orgánico, concentración de la fase acuosa y purificación. Los controles físico-químicos y biológicos durante las etapas del proceso en el producto final demuestran la requerida reproducibilidad lote a lote.

La protección de este extracto único con una marca internacional tiene el objeto de diferenciarlo de otros extractos no estandarizados que pudieran haber sido obtenidos de plantas silvestres, sin una rigurosa identificación botánica y sin los estrictos controles de calidad y criterios de selección y recolección que se aplican a las plantas cultivadas.

A partir de EXPLY-37 se pueden obtener formas líquidas (jarabes y cápsulas blandas) y formas sólidas (polvo, cápsulas duras y comprimidos), utilizando distintos excipientes. La mezcla de extracto de EXPLY-37 con rizoma esterilizado y triturado, seguida de secado y homogeneización, da lugar a un polvo que corresponde a la marca EXPLY y que puede administrarse como tal o en forma de cápsulas.

Los estudios llevados a cabo por Fresno y cols. (*461*) en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (Universidad Autónoma de Madrid) sobre la acción inmunomoduladora del Phlebodium decumanum (PD) en modelos experimentales *in vitro*, llegaron a las siguientes conclusiones:

1. El PD tiene una acción reguladora de los niveles elevados de TNFα, cuando los macrófagos son estimulados por LPS y IFT-γ

2. Dicho efecto se produce por el aumento de la liberación de receptores solubles (sTNF-R) que bloquean parcialmente (hasta un 80%) dichos picos de liberación de esta citoquina.

El uso de Phlebodium decumanum en enfermos de SIDA se remonta a 1995 en Honduras. El Departamento de riesgos Poblacionales del Ministerio de Salud de Hondura, trató pequeños grupos de adultos enfermos de SIDA recuperando el apetito, el peso y la calidad de vida de estos pacientes. Estos resultados preeliminares constituyeron la base de un estudio doble ciego llevado a cabo en el Instituto del Torax de Tegucigalpa con la colaboración de la Universidad de Miami, School of Medicine.

Los resultados de estos estudios han sido presentados en el reciente Congreso Centroamericano de VIH/SIDA celebrado en San Pedro Sula (Hondura) con el apoyo de importantes organismos internacionales, tales como ONUSIDA y UNICEF e instituciones como la propia Universidad de Miami, la agencia de Cooperación Española y los Ministerios de Salud de los Países del área centroamericana.

En otro estudio llevado a cabo en niños con enfermedad VIH/SIDA de edades comprendidas entre 9 y 10 años, y controlado en el Hospital Mario Catarino Rivas de San Pedro Sula, se ha demostrado, igualmente una mejoría en la calidad de vida de los niños con la recuperación del apetito y ganancia de peso.

También el uso del *Phlebodium decumanum* se ha visto que actúa en la reversión del síndrome de sobreesfuerzo físico y de los efectos negativos del mismo. *De Teresa y cols* (*582*), estudiaron el efecto del extracto de PD en ciclistas sobre el rendimiento deportivo,y la prevención del daño oxidativo y la disfunción inme ligados al sobreesfuerzo físico. En este estudio, a pesar de la moderada intensidad del entrenamiento físico, los resultados mostraron una mejora significativa del rendimiento físico a nivel máximo (watios, lactato y cociente respiratorio máximos en cicloergómetro) y submáximo (reducción de la frecuencia cardiaca a nivel submáximo: 250 watios) en comparación con el grupo placebo. De igual forma, los resultados obtenidos sobre el daño oxidativo (daño oxidativo del ADN mitocondrial) y la disfunción inmune (IL-1, IL-6, TNF, TNF-rs y IL-1ra)

La práctica del deporte y, en especial, el ejercicio físico prolongado, cada vez más habitualmente observado entre la población general, puede desencadenar una respuesta de este tipo debido a que el esfuerzo físico suele ser relativamente más intenso de los ideal para la población que practica ejercicio y deporte cotidianamente.

Al igual que la utilización de antioxidantes, como medida preventiva para el daño oxidativo porducido por el ejercicio de mayor intensidad, está muy extendido entre la población activa, no se había demostrado que ningún otro suplemento pudiera prevenir la disfunción inmune subsiguiente al daño oxidativo, que además es la que perpetúa dicho estado de catabolismo progresivo.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

3.1. PROCESO DE MUESTREO

Se han utilizado ratas albinas de la cepa Wistar *(r.novergicus)* macho. Suministradas por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. De un total inicial de 60 ratas, sólo fueron seleccionadas para el experimento 40 ratas jóvenes con un peso inicial total entre 247.8 y 360.5 gramos.

La muestra fue dividida en cuatro grupos (n=10) cada uno alojado en cubetas independientes de makralon dispuesta en rack de acero inoxidable, con lecho de viruta. La conformación de los cuatro grupos se hizo intencionalmente en atención a la capacidad de adaptación de los animales para correr sobre el tapiz rodante.

Los dos grupos experimentales de ratas extenuadas con o sin *Phlebodium decumanum (PD)* se seleccionaron de aquellos animales que mejor se adaptaron al ejercicio (n=20) y fueron asignados a cada grupo experimental aleatoriamente (n=10) Los otros dos grupos controles (n=20) se formaron al azar entre las ratas que tenian menos habilidad para correr sobre esta plataforma rodante.

Ambos grupos de animales tanto extenuados como sedentarios fueron pesados al inicio, cada 7 días y, al término del experimento.

3.2. FORMACIÓN DE LOS GRUPOS Y CARACTERÍSTICAS

Los grupos formados (n=4) y sus características pondérales al inicio del experimento fueron las siguientes:

Grupo **E**	(+Ejercicio -PD)
Grupo **E+PD**	(+Ejercicio +PD)
Grupo **S+PD**	(-Ejercicio +PD)
Grupo **S**	(-Ejercicio -PD)

El peso promedio por grupo de ratas fue; Grupo E (X±DE); 295.8±34.2, Grupo E+PD; 316.5±19.5, Grupo S+PD; 312.7±31.3, Grupo S; 302.2±39.2

3.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES Y DE ADAPTACIÓN.

Los animales fueron mantenidos durante toda la experiencia en el estabulario del laboratorio a una temperatura de 22 ± 1ºC, con un 60% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12 horas de luz y de 12 horas de oscuridad. El tratamiento de los animales en este experimento fue de acuerdo a lo establecido por la *University Animal Care Review Comité.*

Durante la primera semana cada jaula de diez animales fue dotada de comederos y bebederos, con libre acceso al agua y a la dieta, que era suministrada *ad libitum* y, cambiadas a diario de manera simultanea y a la misma hora.

Fueron alimentadas con una dieta estándar de pienso comercial para ratas (Pienso A.03 de PANLAB S.L. Barcelona, España). Las otras 5 semanas siguientes se utilizó para la alimentación de los cuatro grupos de ratas con una dieta semisintética formulada según los criterios del AIN (1977), cuya composición se ilustra en la Tabla 1.

Componentes	*%*	*GRAMOS**
Caseína	18.5	925
Almidón	15.0	750
Sacarosa	48.5	2425
Celulosa	5.0	250
Colina	0.2	10
Metionina	0.3	15
Grasa**	8.0	400
Corrector Vitamínico*	1.0	50
Corrector mineral**	3.5	175

Tabla 1.- Composición de la dieta **Anexos

Gramos para preparar 5 kg de dieta

Los animales de los grupos E+PD y S+PD respectivamente se les suplió la dieta antes mencionada con *Phlebodium decumanum (PD)* en una dosis de 100 mg/kg de peso rata al día, durante una semana previa y durante todo el tiempo que duró el experimento. Todos los ejemplares salvo lo anteriormente señalado se mantuvieron en las mismas condiciones de adaptación ambiental y alimenticias durante el mismo período de tiempo.

La conformación definitiva de los grupos experimentales y controles se hizo durante la primera semana en atención al nivel de adaptación de los animales para correr sobre el tapiz rodante. De las ratas que demostraron ser capaces de desplazarse sobre la cinta rodante (Fixma S.A Valencia, España) se seleccionaron para la formación de los dos grupos de ejercicio (E y E+PD) sólo aquellas que durante una prueba de esfuerzo que se inició a una velocidad constante con ligeros aumentos de velocidad pudieron mantener durante 4 a 5 minutos el ritmo de carrera impuesto, a una intensidad máxima, sin la necesidad permanente de aplicar estímulos externos durante la ejecución de la carrera.

Los niveles de intensidad fueron: primer período X±DS; 30.0±1.7 m/min, segundo período; 35.0±2.5 m/min, tercer período 40.0±3.5 m/min y cuarto período 45.0±4.2 m/min. Los animales que constituyeron los dos grupos sin ejercicio (S+PD y S), fueron aquellos que se adaptaron con mayor dificultad al ejercicio siendo distribuidos aleatoriamente en sus respectivos grupos.

Una vez terminado el proceso de formación de grupos la segunda semana se utilizó para adaptar a los animales a la dieta semisintética y al ejercicio. Las ratas que constituyeron los grupos con ejercicio corrieron sobre la cinta rodante diariamente durante esta semana por un período de 15 minutos a velocidades constantes con cambios de velocidades que oscilaban entre 0.3 y 0.5m/min.

Las sesiones de extenuación física se realizaron respetando el mismo protocolo utilizado el día anterior, el orden de los entrenamientos por grupo y subgrupos de ratas, se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones circadianas y ambientales. La hora de los episodios de esfuerzo máximo fue entre las 8:00 AM y las 13:00 PM en subgrupos de 5 ratas cada vez.

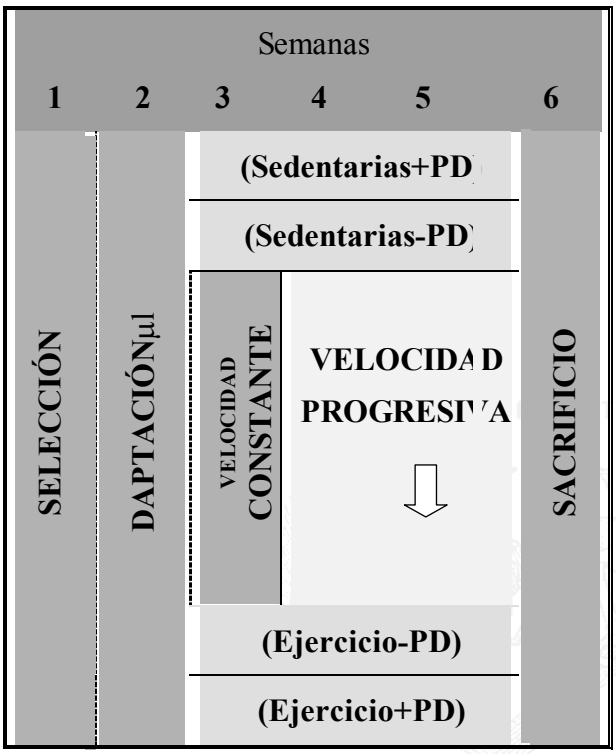
El experimento se inició la tercera semana, los dos grupos de ratas corredoras (E y E+PD) con o sin suplementación de PD iniciaron su programa de ejercicio físico exhaustivo durante cuatro semanas. El tratamiento experimental correspondió a un modelo de esfuerzo físico progresivo y continuo de cuatro períodos de 15 minutos cada uno, con un tiempo total de duración de 60 minutos.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El protocolo fue el mismo que se aplicó en el período de adaptación de las ratas. Aumentándose ligeramente las velocidades hasta llegar a las intensidades deseadas y manteniendo para todos los grupos solamente el libre

acceso de agua durante todo el tiempo de los entrenamientos. Los animales que no alcanzaban cumplir con el tiempo estipulado eran retirados de la cinta rodante registrándose el último período de trabajo terminado y la cantidad de metros recorridos con el objeto de reproducir el esfuerzo faltante al término de cada sesión de trabajo. El diseño experimental se ilustra en la siguiente tabla.

3.4.1. Programa de extenuación física



Durante esta semana se dio inicio al entrenamiento de los animales corriendo, a velocidades constante X±DS; 28.0±0.8 m/min. La cuarta, quinta y sexta semana se aplicaron carreras progresivas y máximas de cuatro períodos. Las velocidades promedios de las carreras fluctuaron entre 33 y 43 m/min durante la cuarta semana, la quinta entre 36 y 47 m/min, y la sexta entre 37 y 48 m/min. El protocolo de entrenamiento diario por semana se ilustra en el Gráfico I.

GRAFICO I

PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO PROGRES

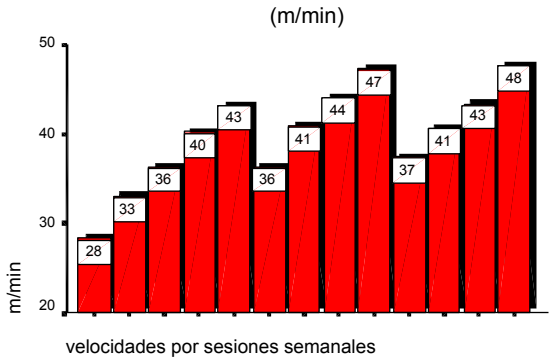
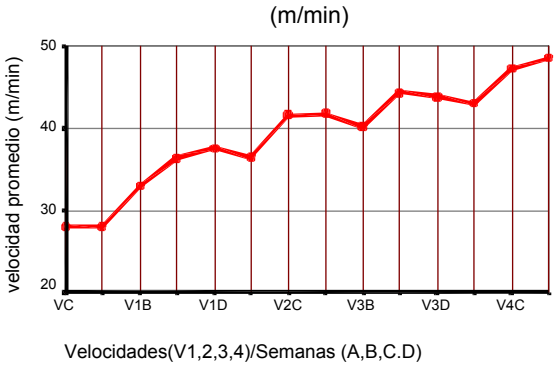


GRAFICO II

INCREMENTO SEMANAL DE LAS VELOCIDAI



El Gráfico II se ilustra el incremento semanal de las velocidades. La primera semana (A) la velocidad fue constante. Las velocidad uno (V_1) que correspondió al primer período de carrera de la cuarta semana (B), aumentó de 33.0±1.4 m/min a 36.4±1.8 m/min para la quinta semana (C), para terminar la sexta semana (D) a una velocidad de 37.6±1.6 m/min. La velocidad dos (V_2) del segundo período se inició a 36.5±2.9 m/min (B), aumentando de 41.6±2.7 m/min (C) a 41.8±2.9 m/min (D). La velocidad tres (V_3) de 40.2±4.2 m/min a 42.3±4.6 m/min, para terminar a 43.8±4.2 m/min. Por último la velocidad cuatro (V_4) se incrementó de 43.0±6.2 a 47.3±6.4 m/min, para terminar la última semana a una velocidad promedio de 48.4±6.3m/min.

3.5. PRESENTACIÓN DE VARIABLES.

La variable independiente de interés para el presente estudio fue definida como el ejercicio físico extenuante y crónico, llevado a cabo por medio de carreras progresivas y repetitivas diarias de una hora, siete veces a la semana, las que se iniciaban a velocidades submáxima (±35m/min) cercanas a un consumo máximo de oxígeno (VO_2 max.) estimado entre un 65% y 75% para este tipo de animales *(128)(129)(130)*, y finalizando el esfuerzo, en el último período de trabajo creciente cuando se llegaba a la extenuación de las ratas, lo que se hacía evidente al no poder éstas mantener el ritmo impuesto, al ser arrastradas, por la cinta rodante a los soportes de contención de cada carril.

La variable independiente presentó dos niveles de ejecución; el ejercicio intenso con o sin suplementación de extracto enriquecido de *Phlebodium decumanum* (100 mg/kg/día), que es obtenido a partir de una fracción hidrosoluble de fronde, purificada y estandarizada. Asignándose a esta fracción el código interno *Exply-37*, obtenido por extracción hidroalcohólica de los frondes maduros, secos y triturados, seguida de la eliminación del disolvente orgánico, concentración de la fase acuosa y purificación.

El número 37 corresponde al procedimiento seleccionado entre los ensayados durante la etapa de desarrollo de los trabajos de puesta a punta y estandarización del método definitivo. La mezcla del extracto *Exply-37* con rizoma esterilizado y triturado, seguida de secado y homogeneización, da lugar al polvo que corresponde a la marca *Exply* y que fue administrado en este experimento.

Las variables dependientes fueron dos, operacionalizadas en primer lugar como; el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico en diferentes tejidos (plasma, corazón, hígado y músculo), el que se caracteriza por un incremento de radicales libres o especies reactivas de oxígeno *(109)(110),* que se forman en las células por un sin número de procesos, tales como la pérdida

de electrones en la cadena respiratoria, activación de los leucocitos y reacciones enzimáticas, sobrepasando los sistemas naturales de defensa antioxidante y produciéndose daño celular.

Las variables controladas medidas para establecer una relación causa y efecto medidas en los tejidos del hígado, músculo esquelético y corazón fueron; las concentraciones de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), y los compuestos derivados de la reacción de radicales libres con lípidos, los Hidroperóxidos (ROOH).

También la medición de las concentraciones de antioxidantes en plasma y membrana mitocondrial, de tocoferol, retinol, coenzima Q_9 y la actividad enzimática antioxidante citoplasmática la Superóxido Dismutasa (SOD), la Catalasa (CAT) la Glutation Peroxidasa (GPX) .

La supresión del sistema inmune fue evaluado a partir de las determinaciones en el plasma de los antagonistas de la IL-1 (IL- ra), receptores solubles (TNF-$_r$S), IL-1, IL-6 y TNF alfa.

Por último la funcionalidad mitocondrial fue evaluada por medio de la medición de la cantidad de citocromos $a+a_1$, b, $c+c_1$ y la actividad de la enzima ciotcromo oxidasa y turnover de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria.

3.6. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.

Los animales fueron sacrificados por decapitación 24 horas después de haber terminado el experimento, fueron decapitadas 8 ratas diariamente durante cuatro días con una diferencia de 48 horas, se sacrificaron cuatro de un grupo y cuatro de otro (n=31), partiendo por las que hacían ejercicio.

Obteniéndose en primer lugar la sangre, que fue depositada en tubos plásticos tratados con heparina de litio y centrifugados a 1730 x g en una centrífuga de mesa refrigerada (Beckman GS-6R) durante 15 minutos a una temperatura de 4ºC, extrayéndose el plasma y repartiéndose en viales eppendorf que fueron congelados en un refrigerador Arcón (Revco) a -80ºC hasta el momento de la analítica.

Los tejidos empleados para el estudio fueron sangre, corazón, hígado y el músculo esquelético vastus lateralis de la pata trasera izquierda del animal.

Los órganos fueron lavados con Tampón de Sacarosa (Sacarosa 0.32M, Tris 10mM y EDTA-Na_2 10mM) con un pH de 7.6. Posteriormente fueron secados, pesados y envueltos en papel aluminio para ser congelados a -80ºC hasta su procesamiento.

3.7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS CITOPLASMÁTICAS Y MEMBRANAS MITOCONDRIALES.

3.7.1. Tejido hepático y miocárdico.

El procesamiento de los órganos para la obtención de mitocondrias y citosoles se llevó a cabo el primer día de sacrificios en hígados y corazones frescos, los que fueron limpiados troceados y resuspendidos en 5 ml de Tampón de Sacarosa en el caso de los corazones y, en 30 ml de Tampón Sacarosa-albumina los hígados.

Ambos órganos fueron fraccionados con una cuchilla automática (Polytron) y homogeneizados en un poter con pistón de teflon (Heidolph). Para la obtención de sobrenadantes y pelet se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga J2-21 a una temperatura de 4ºC, el sobrenadante obtenido de los corazones y sólo en el caso de los hígados fueron filtrado con gasa y ambos centrifugados a 8000 rpm durante 20 minutos.

El pelet obtenido fue guardado en hielo y oscuridad y el sobrenadante fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos del cual se obtuvieron los citosoles de corazones e hígados, el pelet obtenido se unió al guardado y se resuspendió en 25 ml de Tampón de Sacarosa y centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se desechó dejando solamente el pelet para la obtención de membranas mitocondriales de ambos órganos, el que fue resuspendido en 2 ml de Tampón de Sacarosa para luego ser homogeneizado y congelado en sus respectivos viales a -80ºC.

3.7.2. Tejido muscular.

En el caso de los músculos éstos fueron procesados al día siguiente de los sacrificios, y resuspendida cada muestra en 40 ml de Tampón de Sacarosa. Una vez fraccionados y homogeneizados fueron filtrados en una malla de 400 μm y centrifugados a 2000 x g durante 10 minutos.

El sobrenadante obtenido fue guardado en hielo y oscuridad, el pelet fue resuspendido en 10 ml de Tampón de Sacarosa y pasado tres a cuatro veces por el poter, para luego centrifugarse nuevamente a 2000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se juntó con la fracción guardada y se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos. Guardándose las muestras de citosoles obtenidos en viales eppendorf. El pelet fue resuspendido y homogeneizado en 2 ml de Tampón de Sacarosa para las fracciones mitocondriales de músculo.

3.8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

La analítica para la cuantificación del contenido proteico de las distintas fracciones celulares se hicieron por el método de *Lowry et al (1951),* el que se fundamenta en dos reacciones complementarias; por un lado el Biuret,

característico del grupo NH_2 y el Folin típico de OH reductores (grupos fenólicos).

Los reactivos utilizados fueron:

- Tampón Sacarosa.
- Solución de Folin.
- Solución de Biuret (preparado por la mezcla de la solución Carbonato de Sodio y Sulfato de Cobre pentahidratado y tartarato sódico).

La preparación de los reactivos fue:

- Tampón Sacarosa (pH=7,6).

Para la preparación del tampón sacarosa fue necesario pesar 109,536 g de sacarosa (032,M y PM=342,30), 1,244g de Tris (10mM y PM=123,14), y 0,3732 g de EDTA (3mMy PM=372,24), completando el volumen para 1 litro con agua bidestilada. Para un Tampón de Albumina al 0,4% se adicionó 4 g de esa sustancia.

- Solución del Folin.

El Folin es un reactivo que fue diluido en una proporción de 1:1 en agua bidestilada

- Solución del Biuret.

Para preparar la solución de Carbonato de Sodio (Na_2C0_3) o de Sosa (NaOH) fue necesario pesar 4 g de sosa y 20 g de Na_2C0_3 completando el volumen para 1 litro con agua bidestilada.

La preparación de Sulfato de Cobre al 1% (Cu_2SO_4) y tártaro de Sodio al 2% fue necesario 1g de Cu_2SO_4 completando un volumen para 100ml con agua bidestilada. Preparándose paralelamente una solución de Tartarato de Sodio, 2 g en un volumen de agua bidestilada para completar 100ml. Mezclándose las dos soluciones en proporción de 1:1.

La solución Biuret fue preparada por la mezcla de las dos soluciones en proporción de 50:1.

El procedimiento para su determinación a cada tubo se le añadió un cierto volumen de muestra expresado en microlitros según el tipo de tejido analizado. Luego se le agregó Tampón de Sacarosa hasta completar 1 ml. Una vez agitado se le añadió 5 ml de reactivo de Biuret, agitándose y esperándose en oscuridad durante un tiempo de 15 minutos. Una vez terminado este período se le agregó a cada muestra 0.5 ml de Folin agitándose nuevamente y esperándose en oscuridad durante 20 minutos.

La medición se hizo por espectrofotometría a una densidad óptica de 640nm.

3.9. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

3.9.1. Hidroperóxidos (ROOH)

La determinación de los Hidroperóxidos (ROOH) se realizó por la técnica de *Fox,* que se basa en la reacción donde el Fe^{2+} reducido pasa a Fe^{3+} oxidado, caracterizándose la reacción por una donación de un anión negativo mediado por la acción del reactivo FOX.

El xilenol orange (XYL. OR) es un colorante sensible a las oxidaciones de hierro, caracterizándose por presentar un color naranja. El caso de los hidroperóxidos, esta situación se ejemplifica cuando el hierro actuó como metal de transición en la peroxidación. Cuando mayor fue la presencia de hidroperóxido, mayor fue la intensidad del color naranja.

El amonio sulfato ferroso (AMN. SUL.) es la fuente de hierro para la peroxidación, mientras el 2-2 Azobis amidinopronano (AAPH) es un fuerte inductor de la peroxidación lipídica, así como la mayoría de los compuestos azo.

Los reactivos empleados fueron:

- Fox
- Acido sulfúrico (H_2SO_4) a 250 mM, hasta completar 100 ml de solución.
- BHT 880mg,
- XYL.OR 75mg.
- AMM.SUL 98mg.
- Metanol anidro 900ml
- AAPH 0,013g en 1ml de agua bidestilada.

Para tal efecto se utilizaron dos tubos para cada muestra (T_0 y T_1) añadiéndose en ambos tubos un volumen correspondiente a 100 µg de proteína de membrana mitocondrial. En el tubo T_0 se puso la muestra más un volumen de H_2O bidestilada, en el tubo T_1 la muestra + H_2O bidestilada + 20 µl de inductor En ambos tubos se adiciono agua hasta llegar a un volumen total de 200 µl. Una vez completados los tubos se agitaron y se incubaron en oscuridad a una temperatura de 37º centigrados durante 30 minutos. Tras la incubación

se añadió 1,8 ml de Fox y se volvió agitar. Se esperó durante 75 minutos en oscuridad y se leyó frente a un blanco (1,8 ml de Fox, 200µl H_2O bid) a una longitud de onda de 560 nm.

La conversión a concentración muestral de hidroperóxidos se hizo mediante una curva patrón. Esta fue hecha con tetra-butil-hidropreróxido (TBH) que por tratarse de un reactivo inestable y peligroso a los cambios de temperatura fue guardado en frió. Los patrones para la curva fueron establecidos en 0,2 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM 5 µM, haciéndose las diluciones pertinentes.

Obteniéndose los siguientes resultados T_0 , T_1 , T_0–T_1 de forma que:

- T_0 nos indicó el nivel inicial de hidroperóxidos que hay en la muestra.
- T_1 nos indicó cuanto se ha peroxidado la muestra tras la inducción de la reacción de oxidación.
- T_0–T_1 nos indicó lo peroxidada que resultó la muestra, es decir, cual fue el nivel de protección de las membranas ante una situación de oxidación. Cuando mayor fue la diferencia, menor fue el grado de peroxidación.

3.9.2. Ácido tiobarbitúrico (TBAR)

La determinación del Ácido Tiobarbitúrico (TBAR) se hizo según el método descrito por *Esterbauer y Cheeseman* ligeramente modificado. El método se basa en la reacción entre una molécula de MDA con dos moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico en un medio ácido a 100ºC.

Los reactivos utilizados fueron:

- TBA 8%
- Acético 20% en agua.

La preparación delos reactivos fue:

- El TBA fue preparado al mezclar 0,8g de ácido tiobarbitúrico hasta completar un volumen de 100ml.
- La solución de ácido acético se preparó añadiendo 20ml al 100% en un volumen de agua bidestilada hasta completar 100ml.

Para su determinación se utilizaron un par de tubos por muestra y otro par de tubos blancos. A todos los tubos se les llenó en este orden con 400ml de agua bidestilada, 100ml de muestra de membrana mitocondrial con excepción del par de tubos blanco, 750ml de TBA , 750ml de Acético y solamente al par blanco 100ml de Tampón Sacarosa.

Una vez terminada su preparación se taparon y se agitaron todos los tubos y, se pusieron en baño maría a 100ºC durante 15 minutos, para luego enfriar en agua a temperatura ambiente y centrifugar a 3000 revoluciones durante 15 minutos. Su lectura se hizo en macrocubetas plásticas en el sobrenadante por espectrofotometría a una longitud de onda de 532 nm.

3.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

3.10.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Para la determinación de la Superóxido Dismutasa (SOD) se utilizó la técnica de *Fridovich* (modificada) la que se fundamenta en la medida de disminución de absorbancia a 550 nm, basándose en la inhibición que ejerce la SOD sobre la reducción de citocromo c en presencia de anión superóxido (O_2.-). observándose como la SOD compite con el citocromo c por el radical O_2. -

$$O_2^- + \text{citocromo c } (Fe^{3+}) \rightarrow O_2 + \text{citocromo c } (Fe^{2+})$$

(oxidado) (reducido)

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Tampón carbonato/bicarbonato de sodio 20 mM con un pH 10, conteniendo EDTA 1 mM y azida sódica 10^{-5}M.
- Una solución de Xantina 0.5 nM en tampón,
- Solución de Citocromo c de 0.1 M en tampón.
- Xantina-oxidasa de 0.2 U/ml en tampón.

La preparación de los reactivos se hizo:

- Tampón Carbonato/Bicarbonato de Sodio(Na_2CO_3/$NaHCO_3$)

Se añadió 2,12g/l de Na_2CO_3 (PM=105,99;0,02M) y 1,68g/l de $NaHCO_3$ (PM=84,01;0,02M) a un volumen inferior de1 litro de agua bidestilada .A continuación de adicionó 0,372 g/l EDTA (PM=372,24;0,001M) completándose el volumen hasta 1 litro con agua bidestilada.

La mitad del tampón fue separada para la preparación de los demás reactivos, la otra mitad sufrió adición de 0,00325g de azida sódica (PM=65,01;10^{-5} M).

- Solución de Xantina 0,5 nM en tampón.

Para preparar esta solución bastó añadir 0,076g/l de xantina (PM=152,1) al tampón previamente preparado. Se preparó 100ml de esta solución.

- Solución Citocromo c 0,1M en tampón.

Esta solución fue preparada al añadir 1,24g/l de cirocromo c al tampón. Se preparó 10 ml de esta solución.

- Solución Xantina oxidasa 0,2 U/ml en tampón

La solución de Xantina–oxidasa estaba inicialmente en la concentración de 20U/ml. Como se necesitaba una concentración de 0,2U/ml se tomó 10µl de esta solución por cada mililitro de solución preparada. Se preparó 5 ml tomándose 50µl y diluyéndose en la cantidad de tampón correspondiente.

Se inició la determinación estimando la cantidad de xantina-oxidasa necesaria para reducir la absorbancia del citocromo c entre valores de 0.025 a 0.05 de U de absorbancia por minuto. Se añadió en una microcubeta de 1 ml; 100 µl de solución de citocromo c + 100 µl de solución de xantina + 650 µl de tampón con azida + el volumen de muestra correspondiente a 100 µg de proteínas de citosol. Una vez agitada, se le agregó la cantidad ya determinada de xantina-oxidasa (100µl).

Monitorizándose en el espectrofotómetro el descenso de absorbancia durante 1 minuto a una longitud de onda 550 nm por medio del Time Drive y a una temperatura de 25ºC.

Su interpretación se hizo considerando el descenso de citocromo c como el 100%, sabiendo que una unidad representa el 50% Por lo tanto, el valor encontrado para el incremento en la reducción de la absorbancia del citocromo c (en un intervalo entre 0,025 y 0,05 U) corresponderá al 100% de la actividad. Calculándose entonces el porcentaje correspondiente a las absorbancia encontradas para cada muestra, relacionadas con su equivalente en unidad.

3.10.2. Catalasa (CAT)

La Catalasa (CAT) se midió por el método descrito por *Hugo Aebi*. El que se basa en una acción inhibidora de la catalasa sobre la reacción oxidativa de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La reacción de inactivación de este compuesto es la siguiente:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2\,H_2O + O_2$$

.Los reactivos utilizados fueron:

- Tampón fosfato 50 mM con un pH de 7.0
- 30 mM de Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La preparación de los reactivos fue:

- Tampón Fosfato 50nM Ph 7.0

Se requirió de la adición de 6,81 g/l de hidrógeno fosfato de potasio(KH_2PO_4) de PM=136,09 hasta completar un volumen de un litro de agua bidestilada. Preparándose paralelamente una solución de fosfato monosódico (NaH_2PO_4) 10 de PM=156,01 añadiéndose 7,74 g/l a una cantidad de agua para completar 1 litro de solución. Una vez preparadas las dos soluciones se mezclaron en una proporción de 1 parte de (KH_2PO_4) para 1,5 de (NaH_2PO_4) (1:1,5).

- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30 nM.

Se preparó añadiéndose una dilución de 0,34 ml de (H_2O_2) al 30% a una cantidad de tampón fosfato hasta completar 100 ml de solución.

La técnica consistió en añadir en una macrocubeta de cuarzo 1800 µl de Tampón fosfato más 200 µl de dilución de citosol (950:50). Una vez ubicada la cubeta en el espectrofotómetro se agregó rápidamente 1000 µl de H_2O_2, bajándose la tapa del espectrofotómetro de manera casi inmediata a su adición para no perder actividad. La lectura se hizo al aire sin un blanco, monitorizándose el descenso a 240 nm durante un intervalo de tiempo de 30 segundos con Time Drive.

La interpretación de los resultados fue hecha utilizándose una constante de primer orden para definir las unidades de Catalasa y la relación de la constante K/µl de citosol o K/mg de proteína para una actividad específica Se tomó el paso de la absorbancia [valor inicial (A1) y valor final (A2)] en un intervalo de tiempo determinado (Δt), de acuerdo al gráfico encontrado siendo $K=(2,3/ (\Delta t) (\log A1/A2)$.

3.10.3. Glutation peroxidasa (GPX)

La determinación de la Glutation Peroxidasa (GPX) se hizo a partir del método ligeramente modificado y descrito por *Leopold Flché y Wolfgang A. Gunsther*. El que cosiste en determinar el descenso enzimático dependiente e independiente de NADPH y el descenso no enzimático. En este caso se determinó el descenso enzimático dependiente de NADPH Utilizándose los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato potásico (KH_2PO_2) 0.1M. con un pH 7.0, conteniendo EDTA 1mM y Azida sódica 1mM.
- Glutation reductasa 2.4 U/ml en tampón sin azida,
- Glutation reducido (GSH) 10mM en tampón,
- NADPH 1.5mM en tampón de $NaHCO_3$ al 0.1%
- Cumeno Hidro peróxido (80%) 12 mM

Su preparación fue la siguiente:

- Tampón fosfato potásico 50nM pH 7.0

Se requirió de la adición de 6,81g/500 ml de hidrógeno fosfato de potasio(KH_2PO_4) de PM =136,09 y 0,186g/500ml de EDTA de PM =372,24 a una cantidad de agua bidestilada hasta completar un volumen de 500ml. Separándose 400ml donde se añadió 0,026g/400 ml de azida sódica, de PM=65,01. Los otros 100ml se guardaron para la preparación de otros reactivos.

- Glutation reductasa 2,4 U/ml en tampón azida

Se preparó añadiéndose 20µl de una suspensión de glutation reductasa en una concentración de 5mg/ml (o 120U/mg o 600U/ml), hasta completar 5 ml con la adición del tampón,. cuya concentración final fue de 2,4 U/ml.

- Glutation reducido (GSH) 10 nM

Requirió la adición de 0,031 de GSH de PM=136,09 en tampón fosfato hasta completar un volumen final de 10ml.

- Cumeno Hidroperóxido al 80% 12nM

Esta solución fue preparada añadiéndose 221µl de Cumeno hidroperóxido PM=152,2 a una cantidad de agua bidestilada necesaria para completar un volumen de 100ml.

- NADPH 1,5nM en tampón de carbonato de sodio ($NaHCO_3$) al 0,1 %.

Requirió de la preparación previa de tampón carbonato ($NaHCO_3$) añadiéndose 0,1g hasta completar 100ml de agua bidestilada. Para luego añadir 0,013g de NADPH PM=833,4 a una cantidad de tampón carbonato hasta completar 10ml de solución.

La realización de esta técnica se hizo determinando por un lado el descenso no enzimático y el descenso dependiente del NADPH . Se determinó observando el incremento en la absorbancia en un intervalo de 3 minutos.

Para tal efecto se añadió en un tubo de ensayo 700µl de tampón fosfato potásico (KH_2PO_4) , 100µl de glutation reductasa, 100µl de glutation reducido (GSH) y 100µl de NADPH, incubándose por 3 minutos a 37ºC. Para luego adicionarle 100µl de Cumeno hidroperóxido pre-calentado a 37ºC.

La lectura de la absorbancia se hizo a 340nm en un intervalo de 3 minutos a 25ºC. El dato obtenido en esta determinación se restó al descenso enzimático, obteniéndose el descenso enzimático dependiente de NADPH.

Para las determinaciones de las muestras en citosol el procedimiento fue el mismo, añadiéndose 100µl de solución de citocromo c 100µl de solución de xantina, 650µl de tampón de azida más la muestra en cantidad suficiente para que contenga 100µg de proteínas. Efectuándose la lectura a la misma longitud de onda.

3.11. DETERMINACIÓN PLASMÁTICA DE COENZIMA Q_9 (COQ_9), VITAMINA E Y RETINOL.

La determinación plasmática de coenzima Q_9 (CoQ_9), Vitamina E y retinol se hizo a partir del método de *Littarru et al (1991)* por HPLC. Los reactivos utilizados fueron los siguientes.

- Laurilsulfato sódico al 2%.
- Etanol:isopropanol (95:5).
- Hexano.

En el procedimiento utilizado se le añadió a 0,5 ml de plasma en 2 ml de una solución de laurilsulfato sódico al 2%, la que fue agitada, posteriormente se mezcló con 2ml de una solución de etanol:isopropanol (95:5) agitándose y agregándole 5 ml de hexano, se agitó y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm.

Una vez terminada la centrifugación se procedió a la extracción de la fase superior de hexano. Posteriormente se añadió 5 ml de hexano al tubo primitivo y se repitió nuevamente la extracción.

3.12. DETERMINACIÓN EN MEMBRANA MITOCONDRIAL DE UBIQUINONAS (COQ_9) Y VITAMINA E

Las determinaciones de ubiquinonas (CoQ_9) y vitamina E en membrana mitocondrial se hizo por HPCL utilizando el método de *Kroger (1978)* según la técnica descrita por *Battino et al. (1990).* El reactivo utilizado fue.

- Metanol:eter de petróleo (60:40)

La extracción se realizó a partir de 0,5 a 1 mg de proteínas de muestra según el órgano. Esta muestra se completó hasta 0,5 ml con agua bidestilada, adicionándose 2,5 ml de metanol:eter de petróleo siendo agitado durante 30 segundos en un vortex y centrifugándose a 3000 rpm durante 10 minutos, a una temperatura de 4ºC en una centrífuga de brazos oscilantes.

Una vez definidas las diferentes fases, con una pipeta pasteur se tomó la fase superior etérea colocándose en otro tubo guardado en un frigorífico. Se añadió nuevamente 1 ml de éter al tubo primitivo se agitó se centrífugo y se recogió otra vez la fase con el éter. Unida las dos extracciones con éter se cerraron los tubos y se guardaron a –20ºC hasta su análisis.

Para su análisis las muestras fueron secadas bajo nitrógeno y se resuspendieron en 10µl de fase móvil.

La separación cromatográfica de plasma y membrana mitocondrial se hizo mediante el análisis por HPLC en fase reversa utilizando una columna Spherisorb S5 ODS I de 18 x 0,46 cm , con una precolumna del mismo relleno que la columna principal. El instrumento utilizado fue un Beckman Gold System, equipado con un detector Diode Array 168.

La fase móvil empleada ha sido etanol:agua (97:3), con una velocidad de flujo de 1 ml/minuto a 25ºC y un método que dura 10minutos. En el mismo pinchazo fue detectado el CoQ_9, alfa tocoferol y retinol.

Para su cuantificación de CoQ_9, alfa–tocoferol y retinol se han realizado curvas patrón con estándares puros pinchados a concentraciones cada vez mayores, la concentración de los patrones se averiguó espectrofotometricanente de forma previa a su empleo para la curva patrón. Estos patrones se emplearon igualmente para identificar los tiempos de retención de los picos en los cromatogramas.

3.13. DETERMINACIÓN DE CITOCROMOS ($a+a_3$, b, $c+c_1$)

La técnica se basó en la posibilidad de medir espectrofotométricamente el estado oxidado y reducido de los citocromos y posteriormente por diferencia averiguar la cantidad de éstos que hay en una muestra de membrana mitocondrial, utilizándose la ecuación de *Lambert.*

Los reactivos utilizados fueron:

- DOC-Na al 10%
- Tampón Kp con un pH 7,4 1nM
- Ferrocianuro potásico 20nM.

- Ditionito de sodio.

En una macrocubeta desechable de 3 ml se colocó un volumen de muestra equivalente a 2mg de proteínas en el hígado, 0,5 en el músculo y de 1 mg de proteínas en el corazón.

Se añadió 200 µl de deoxicolato sódico (DOC-Na), con el objeto de desintegrar la membrana. Posteriormente, se le agregó tampón hasta completar un volumen final hasta completar un volumen total de 1,7 ml. Adicionándose por último 10 µl de ferrocianuro potásico que oxida totalmente los citocromos existente en la muestra.

Se leyó frente al aire y se procedió realizar el scanner oxidado adicionándole el ditionito sódico que redujo los citocromos. Procediendo luego a realizar el scanner reducido estableciéndose la diferencia entre el espectro reducido y el oxidado.

Los valores de extinción molar para cada citocromo fueron los siguientes:

- Cit $a+a_3$ $A_{605} - A_{630}$ ($24mM^{-1}$ cm^{-1})
- Cit b $A_{561} - A_{575}$ ($25mM^{-1}$ cm^{-1})
- Cit $c+c_1$ $A_{550} - A_{540}$ ($20mM^{-1}$ cm^{-1})

3.14. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO OXIDASA

Se ha determinado la actividad enzimática del complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial a través de un método espectrofotométrico.

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Tampón (Ph=7,4)

50mM CIK	3.728g/l	1.86g/500ml
10mM Tris	1.2114g/l	0.6057g/500ml
1mM EDTA	0.3722g/l	0.181g/500ml

- Solución de Antimicina 0,2mM

Al tratarse de una mezcla de Antimicina A1 y A3 se tomó el PM de ambas y se hizo la media dando PM0=534.6

0.0002moles/I=(nºg/PM)/I

0,1069g/I=100ml o 0.01g en 100ml de Etanol

- Tampón más Antimicina

El tampón se llevó a una cantidad de Antimicina igual a 0.3mg para 100ml de tampón, luego partiendo de la Solución 10mg/100ml Etanol se tomó 3ml de ésta. La solución de Antimicina se añadió al tampón justo antes de usarlo.

- Citocromo C reducido.

Se necesitó Cit C reducido en una concentración de 1,68mM, se utilizó el citocromo C de corazón de caballo oxidado (Cytochrome C from Horse Herat C-2506 de SIGMA).

La cantidad que se tomó fue mucho mayor de lo que realmente se necesitó para esa molaridad, reduciendo el citocromo C pasándolo por una columna donde se diluyó. Se tomó 0.1g de Cit C y se le añadió unos 2,5 ml de H_2O bidestilada en un matraz de 6 ml. Se agitó con una espatulilla hasta su completa disolución, y a continuación se le adicionó una punta de espátula de Ditionito sódico para reducirlo. La solución de Cit C viró de rojo a un rosa intenso y tomó el color característico de azufre del Ditionito, indicando la completa reducción del Cit C.

El siguiente paso fue eliminar el Ditionito, para ello pasamos la solución por una columna de Sephadex (PD-10 Columns Sephadex G-25 M de Pharmacia Biotech). Esta columna está equilibrada con una solución al 15% de Kathon RCG, y fue colocada en un soporte cortándose la punta, se lavó la columna dos a tres veces con agua bidestilada antes y después de ser utilizada, adicionándole la solución de Cit C la que fue recogida una vez pasada por dicha columna. De esta forma el ditionito fue eliminado totalmente cuando la solución de Citocromo C no presentó olor azufre, posteriormente fue tapado, al resguardo de la luz y en frío.

Parara comprobar la reducción del citocromo se realizó un Scan con 20 µl de muestra en 2 ml de H_2O bidestilada el que dio un espectro característico en tres bandas. La banda que fue utilizada fue la de 550 nm.

- Determinación de la actividad de citocromo oxidasa.

Se tomó un volumen de proteínas para cada tejido y se le adicionó 2 ml de tampón con Antimicina y se le agitó, manteniéndose el tampón con la muestra en baño a 37º C hasta su determinación

Se colocó la muestra en la cubeta del espectrofotómetro previamente agitado y se le adicionó 20 ul de Cit C reducido, rápidamente se midió la disminución de Absorbancia en la modalida de Time Drive en el espectrofotómetro.

Obtenido el espectro se calculó la variación de A en el tiempo dando el resultado en ΔmA/min. Para ello se trazó a mano una pendiente sobre el

espectro y se tomó dos puntos calculándose así A2-A1/T2-T1 haciéndose para cada muestra tres medidas y tomándose la media.

- Se calculo la Actividad específica de la citocromo oxidasa con la siguiente fórmula:

Act, esp.=((mA/min)/1000)*(1/19)*(Vf/mg proteínas)

- El turnover se cálculo por la siguiente fórmula:

Turnover= ((Actividad específica *1000)/(a+a_3))/60

3.15. ANÁLISIS DE CITOQUINAS EN SUERO.

Los análisis de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF alfa e IL-6 fueron alanizadas por ELISA *(Biokine, T cell diagnostic, Cambridge MA and R&D. Systems Mineapolis MN)* en el suero de los animales tratados o no, con Phlebodium decumanum, tanto del grupo control como experimental. Así mismo, fue evaluado por ELISA los niveles receptores solubles.

Se pegó el anticuerpo monoclonal especifico a la placa de plástico (Microtiter de 96 pocillos), durante 16 horas a 4º.

Se añadieron muestras y standard en el centro de cada pocillo (50 o 100 microlitros) y dejar incubando 2 horas a temperatura ambiente.

Se lavaron los pocillos 5 veces con phosphate buffered saline (PBS) 0.1%Tween 20.

Se añadieron 100 microlitros de conjugado en cada pocillo (Anticuerpo conjugado frente a la citoquina que este pegada en la placa, unido a peroxidasa de rábano). Dejar incubando 2 horas a temperatura ambiente.

Se lavaron los pocillos 5 veces con PBS

Se añadieron 100 microlitros de sustrato en cada pocillo (Peroxido de hidrogeno acoplado a tetrametil benzidina) y dejar incubando 30 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 100 microlitros de solución stop en cada pocillo (ácido ClH diluido)..

Y se leyó la densidad óptica a 450nm .

La curva estándar se realizó con los siguientes valores en pg/ml:

pg/ml	D.O.	Media	Media corregida
0	0,034		
	0,034	0,034	
12.5	0,085		
	0,080	0,082	0,048
25	0,128		
	0,127	0,128	0,094
50	0,214		
	0,216	0,215	0,181
100	0,383		

	0,372	0,378	0,344
200	0,692		
	0,698	0,695	0,661
400	1,218		
	1,222	1,220	1,186
800	2,023		
	1,988	2,006	1,972

Los valores experimentales de las muestras de plasma de las ratas, andu8vieon siempre por debajo de un Do de 0,80-.0, 90m es decir cercanos o inferiores al 1er punto de la curva por lo que no se pudieron interpretar y comparar los resultados

3.16. TRATAMIENTO DE DATOS.

En el análisis estadístico se utilizaron estalígrafos inferenciales no paramétricos como el análisis de la varianza ANOVA de un factor (one way) y la prueba *post hoc,* el test de Comparaciones Múltiple *de Scheffé* a un nivel de confianza de un 95%. El procesamiento de los datos se realizó con un software estadístico SPSS/PC 10.0 para windows

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

4.1. PESOS PONDERALES DE LOS ANIMALES

En los gráficos siguientes se muestra la evolución semanal de los pesos pondérales de ambos grupos en las ratas extenuadas, grupo (E) con ejercicio físico sin ingesta de *Phlebodium decumanum (PD*), y del grupo E+PD con ejercicio y suplemento alimenticio de PD.

4.1.1. Ratas extenuadas (E)

En la *Figura 1* se ilustra la evolución del peso ponderal del grupo E a lo largo de todo el experimento, desde el primer día de su llegada al laboratorio, con un peso promedio de 292g la primera semana, hasta el término del experimento, donde se registró un peso medio de 283g.

La segunda y tercera barra del gráfico, correspondió a las semanas tanto de adaptación física como de alimentación de estos animales. Quedando en evidencia en este período de catorce días, un incremento normal del desarrollo ponderal que osciló entre 311 a 323 gramos de peso rata promedio.

No obstante, también se observó en este grupo un ligero descenso de los incrementos pondérales, a partir de la primera semana de inició del programa de extenuación física, cuarta barra. El peso promedios disminuyó progresivamente desde su máximo alcanzado de 329 hasta 283g al momento del sacrificio.

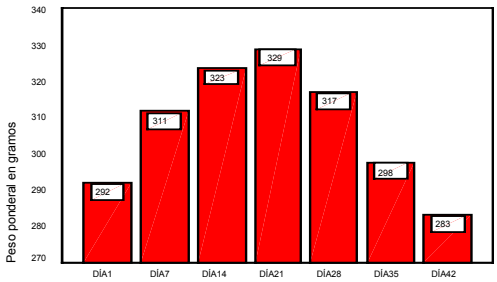


Figura 1. Evolución del peso de las ratas extenuadas (E)

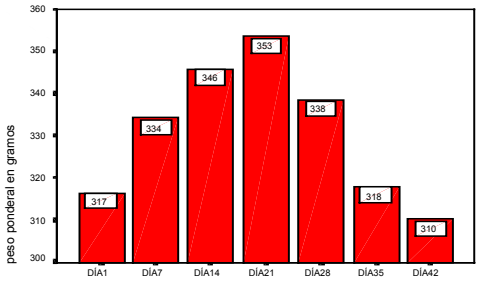


Figura 2. Evolución del peso de las ratas extenuadas (E+PD)

4.1.2. Ratas extenuadas (E+PD)

En la *Figura 2*, se presenta la evolución de los pesos corporales de las ratas del grupo (E+PD) de animales sometidos a ejercicio físico con suplemento alimenticio de PD. En él se observa, un desarrollo y crecimiento normal de estos animales desde el inicio del programa y durante los dos períodos de adaptación, es decir, al término de la primera semana de adaptación a la alimentación, segunda barra (334g) y, el inicio de la etapa de adaptación al ejercicio, tercera barra (346g).

Sin embargo, una vez alcanzado el peso máximo relativo de 353g, se comenzó a evidenciar una disminución progresiva de los pesos pondérales de estas ratas, la que fue observada una vez iniciado el programa de extenuación física, decreciendo el peso promedio de este grupo hasta llegar a los 310g al término del experimento.

Durante el programa de extenuación física, las diferencias de los pesos pondérales de los dos grupos de animales extenuados versus los dos grupos de ratas sedentarias con o sin suplemento alimenticio de PD, se hicieron más evidentes, a partir del día 31. Dichas diferencias fueron halladas entre los menores pesos pondérales de las ratas del grupo E de sólo 317g, versus los otros tres grupos de comparación como se ilustra en la *Figura 3*.

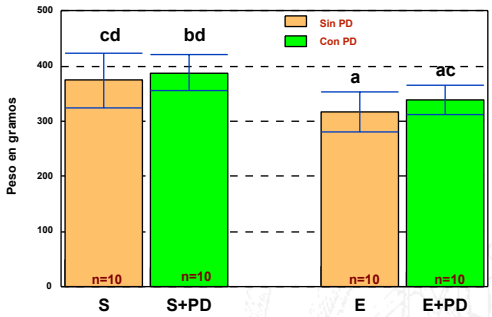


Figura 3. *Peso ponderal promedio de los diferentes grupos de ratas, medido el dia 31 del programa de extenuación física (p<0.05).*

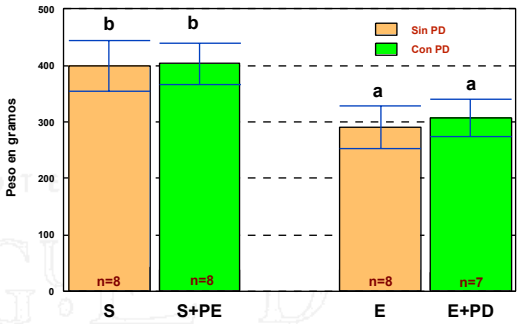


Figura 4. *Peso ponderal promedio de los diferentes grupos de ratas al momento del sacrificio (p<0,05).*

También queda en evidencia en la *Figura 4*, las diferencias pondérales encontradas al momento del sacrificio entre los cuatro grupos de animales. Donde los valores promedios de los pesos corporales de los dos grupos de ratas extenuadas, fueron significativamente (p<0,05) inferiores en comparación a los otros dos grupos de animales sedentarios.

4.2. PESOS DE LOS ÓRGANOS

4.2.1. Hígado

Uno de los órganos estudiados fue el hígado, en la *Figura 5* se ilustran los resultados obtenidos en el peso de este órgano Se observa en este gráfico diferencias significativas entre los dos grupos de animales extenuados y ambos sedentarios.

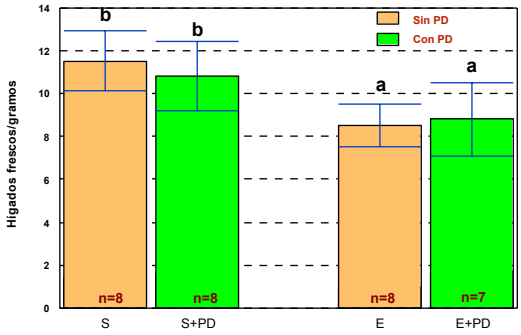


Figura 5. *Pesos promedios de los hígados frescos encontrados en los diferentes grupos de animales (p<0.05)*

Los pesos promedios se encontraron disminuido en los dos grupos de ratas que hacían ejercicio exhaustivo, consignando un peso de 8,56g en el grupo con ejercicio sin PD (E), y de 8,85g en los animales con ejercicio y suplemento alimenticio de PD (E+PD). No existiendo diferencia significativas (p<0,05) entre ambos grupos.

Se muestra además en estos resultados, que los valores promedios más bajos obtenidos en los pesos de los hígados frescos fue encontrado en el grupo de animales extenuados físicamente sin suplemento alimenticio de PD (E), en comparación a los dos grupos de ratas sedentarias.

En los dos grupos de animales sedentarios se hallaron los valores más altos en los pesos de este órgano, consignando el grupo S+PD un peso de 10,8g y el grupo S un peso de 11,5g. No evidenciándose tampoco, diferencias importantes entre ambos grupos de animales con o sin ingesta suplementaria de PD.

4.2.2. Músculo esquelético

Los resultados obtenidos en los pesos promedios de los músculos esqueléticos frescos entre los diferentes grupos de ratas, extenuadas y sedentarias con y sin suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum,* se consignan en la *Figura 6.*

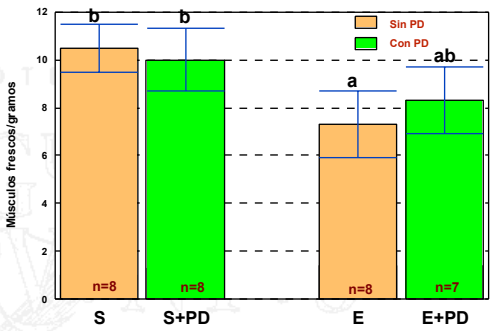


Figura 6. *Pesos promedios de músculos esqueléticos encontrados en los diferentes grupos de animales (p<0,05).*

En este gráfico, se deja en evidencia, un menor peso en los músculos esqueléticos *vastus lateralis* de los dos grupos de animales extenuados físicamente. Sin embargo, esta diferencia fue solamente significativa (p<0,05) en los animales extenuados sin suplemento alimenticio de PD.

No obstante, el peso promedio de 7,39g obtenido en el grupo E fue homogéneo en comparación al grupo de ratas extenuadas con suplemento de PD, quienes registraron un peso de 8,34g.

Se observa también en esta gráfica, una homogeneidad entre los pesos de los músculos esqueléticos del grupo de animales que, fueron extenuados físicamente con PD durante cuatro semanas, y los otros dos grupos de ratas sedentarias, cuyos valores promedios observados fueron de 10,0g en el grupo S+PD y 10,5g en el grupo S. No encontrándose entre estos tres grupos diferencias importantes en sus medias muéstrales.

4.2.3. Corazón

Otro de los órganos estudiados fue el corazón. En la *Figura 7.* se deja en evidencia homogeneidad entre las medias muéstrales de los pesos del corazón en los cuatro grupos de animales.

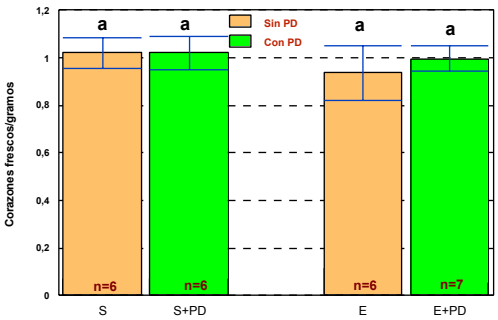


Figura 7. *Pesos promedios de los corazones frescos encontrados en los diferentes grupos de animales (p<0,05).*

Se observa, una ligera tendencia a un menor peso del miocardio en los dos grupos de animales extenuados físicamente. Obteniéndose, en el grupo E de animales un peso promedio de este órgano de 0,93g y en el grupo E+PD 0,99g.

En ambos grupos de ratas sedentarias, el peso del miocardio fue ligeramente mayor en este órgano con un peso promedio para ambos grupos S+PD y S de 1,02g.

4.3. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA Y CITOPLASMÁTICAS

Las proteínas desempeñan una amplia variedad de funciones esenciales en los mamíferos. Estas funciones se pueden agrupar en dos clases: dinámicas y estructurales. Entre las funciones dinámicas se encuentran el transporte, el control metabólico, la contracción y la catálisis de las transformaciones químicas. Mediante sus funciones estructurales, las proteínas proporcionan la matriz para los tejidos conjuntivos y óseos que dan estructura y forma al organismo.

Las concentraciones de proteínas hepáticas de la membrana mitocondrial encontradas en este estudio se ilustran en la *Tabla 1* Los resultados aquí obtenidos dejan en evidencia diferencias estadísticas entre dichas concentraciones en los cuatro grupos de animales sedentarios, extenuados con o sin suplemento de *Phlebodiun decumanum.*

Estos resultados fueron heterogéneos en sus medias cuando fueron expresadas estas concentraciones de proteínas en mg/ml de muestra. La mayor diferencia obtenida ($p<0,05$) fue encontrada en la mayor concentración de proteínas obtenidas en el grupo de ratas sedentarias (S+PD) y el mínimo en el grupo de ratas extenuadas con PD.

GRUPOS EXPERIMENTALES	mg/ml X+EEM	mg/g de órgano X+EEM
E	19,5±1,2(a+b)	6,10 ±0,3(a)
E + PD	15,7±1,0(a)	4,85±0,4(a)
S	21,2±0,9(a+b)	5,26± 0,4(a)
S + PD	27,6±5,0(b)	7,13 ± 0,9(a)

Tabla 1.- *Concentraciones de proteínas de membrana mitocondrial de hígado, en los cuatro grupos de animales. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05).*

Sin embargo, cuando se expresaron estos resultados por gramo de órgano fresco se observó homogeneidad en las medias muéstrales, fluctuando dichas concentraciones de proteínas entre el máximo obtenido de 7,13 mg/g de órgano en el grupo de ratas sedentarias con PD y el mínimo de 4,85 mg/g de tejido hepático en el grupo de ratas extenuadas con PD.

Diferentes fueron los resultados obtenidos en las concentraciones de proteínas citoplasmática del hígado cuando estas fueron expresadas en mg/ml de muestra y por gramos de órgano cuyos resultados se ilustran en la *Tabla 2.*

Las concentraciones de proteínas citoplasmática de hígado expresadas en mg/ml fueron similares a los resultados ante obtenidos. Evidenciándose diferencias significativas entre los grupos de animales sedentarios y extenuados.

GRUPOS EXPERIMENTALES	mg/ml X+EEM	mg/g de órgano X+EEM
E	13,7±1,4(a)	4,39±0,5(a+b)
E + PD	12,7±1,0(a)	3,86±0,2(a)
S	23,1±0,9(b)	5,80± 0,3(c)
S + PD	23,7±1,2(b)	6,32±0,5(b+c)

Tabla 2.- *Concentraciones de proteínas citoplasmáticas de hígado, en los cuatro grupos de animales. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05).*

La concentración más elevada fue obtenida en el grupo S+PD con una tasa de proteínas de 23,7 mg/ml y el más bajo de 12,7 mg/ml de muestra en los animales extenuados con PD.

No obstante, aquí también se observaron diferencias significativas en las concentraciones citoplasmáticas de proteínas expresadas por gramo de órgano fresco entre los dos grupos de ratas sedentarias versus los animales extenuados físicamente. No evidenciándose diferencias estadísticas en ambos grupos entre sí.

Las concentraciones de proteínas más altas obtenidas fue de 6,32 mg/g de órgano encontradas en el grupo de ratas sedentarias (S+PD) y las más bajas de 3,86 mg/g de órgano fresco obtenido en el grupo de ratas extenuadas con ingesta alimenticia de PD.

GRUPOS EXPERIMENTALES	**mg/ml** **X+EEM**	**mg/g de órgano** **X+EEM**
E	3,84±0,4(a+b)	1,37± 0,1(a)
E + PD	2,72±0,2(b)	0,87± 0,09(a)
S	4,69±0,2(a+c)	1,21± 0,09(a)
S + PD	5,60±0,9(a+b)	1,50± 0,2(a)

***Tabla 3**.- Concentraciones de proteínas de membrana mitocondrial de músculo esquelético, en los cuatro grupos de animales. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05).*

En la *Tabla 3* se muestran los resultados hallados en las concentraciones de proteínas encontradas en las membranas mitocondriales de los músculos esqueléticos. En esta tabla también se ilustran las concentraciones promedios de proteínas expresadas tanto en mg/ml como en mg/g de órgano fresco en los cuatro grupos de animales.

En estos resultados las diferencias observadas en dichas concentraciones no fueron estadísticamente significativas entre los grupos de animales cuando fueron expresadas en mg/gramos de tejido muscular.

Sin embargo, sí se obtuvieron diferencias significativas (p<0,05) cuando fueron expresadas en mg/ml de muestra entre los grupos de animales que fueron sometidos a ejercicio extenuante (E+PD) comparados con las ratas sedentarias (S).

El valor más alto encontrado en las concentraciones de proteínas fue obtenido en los animales sedentarios con PD (S+PD) y el más bajo en las ratas extenuadas con suplemento alimenticio de PD (E+PD).

Las concentraciones de proteínas citoplasmáticas de los músculos esqueléticos de los animales sedentarios y ejercicio exhaustivo con o sin ingesta suplementaria de PD se muestra en la *Tabla 4*. En estos resultados no se observan diferencias significativas en la cantidad promedio de proteínas cuando fueron expresadas por gramos de órgano fresco.

No obstante, cuando estos mismos resultados son expresados en mg/ml de muestra se obtuvieron diferencias significativas ($p<0,05$) en las concentraciones de proteínas citoplasmática del músculo esquelético entre los cuatro grupos de animales.

GRUPOS EXPERIMENTALES	**mg/ml** X+EEM	**mg/g de órgano** X+EEM
E	4,84±0,52 (a)	1,51± 0,17 (a)
E + PD	5,54±0,29 (a+c)	1,69± 0,12 (a)
S	7,21±0,48 (b)	1,84± 0,17 (a)
S + PD	7,78±0,56 (b+c)	2,13± 0,23 (a)

***Tabla 4**.- Concentraciones de proteínas citoplasmáticas de músculo esquelético, en los cuatro grupos de animales. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05).*

Observándose una mayor concentración en ambos grupos de ratas sedentarias en comparación a los otros dos grupos de ratas extenuadas. La concentración más alta encontrada correspondió al grupo de animales sedentarios con ingesta alimenticia de *Phlebodium decumanum* (S+PD) y la menor concentración en los animales extenuados sin PD (E). Sus diferencias estadísticas se muestran en la *Tabla 4.*

En la *Tabla 5* se muestran los resultados de las concentraciones de proteínas obtenidas en la membrana mitocondrial del corazón en los cuatro grupos de ratas. Estos resultados dejan en evidencia diferencias significativas entre sus medias

muéstrales, cuando fueron expresadas en mg/ml de muestra. No obstante, no se observan diferencias significativas cuando fueron expresadas por gramo de órgano.

GRUPOS EXPERIMENTALES	mg/ml X+EEM	mg/g de órgano X+EEM
E	1,65±0,13 (a+b)	4,38± 0,35(a)
E + PD	1,16±0,09 (a)	2,78± 0,23(a)
S	1,48±0,52 (a+b)	3,89 ±0,54(a)
S + PD	2,00±0,43 (b)	4,75± 1,05(a)

***Tabla 5**.- Concentraciones de proteínas de membrana mitocondrial de corazón, en los cuatro grupos de animales. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05).*

También las concentraciones citoplasmáticas del corazón en ambas unidades se obtuvieron los mismos resultados a los encontrados en la membrana mitocondrial de éste mismo tejido, tanto en los grupos de ratas sedentarias, extenuadas con o sin suplemento alimenticio de PD.

GRUPOS EXPERIMENTALES	mg/ml X+EEM	mg/g de órgano X+EEM
E	3,91±0,45 (a+b)	1,22± 0,14(a)
E + PD	2,86±0,64 (a)	0,92± 0,25(a)
S	3,14±0,50 (a+b)	1,18 ±0,15(a)
S + PD	4,87±0,66 (b)	0,83± 0,08(a)

***Tabla 6**.- Concentraciones de proteínas citoplasmáticas de corazón, en los cuatro grupos de animales. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05).*

4.4. BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

4.4.1. Concentraciones de hidroperóxidos (ROOH)

La peroxidación de los lípidos se define como el daño oxidativo provocado especialmente en los ácidos grasos insaturados. Se trata de una reacción en cadena o autocatalítica, es decir que, una vez comenzada continúa desarrollándose por sí misma. La iniciación se produce cuando la unión C-H de los PUFA sufre la abstracción del hidrógeno de la doble ligadura susceptible de ser abstraído por los radicales libres, fundamentalmente el HO.- lo que genera un radical lipídico.

Teniendo el átomo de H un solo electrón, la sustracción de H del grupo metileno produce un radical ácido graso (R.) al dejar un electrón desapareado en el carbono.

La propagación una etapa en la que el R. se combina con el oxígeno formando un lipoperóxido (ROO.). Este peróxido puede retirar un nuevo hidrógeno de otro carbono molecular. De esta manera persiste el proceso autocatalítico que convierte el carbono del ácido graso de los fosfolípidos de membrana en hidroperóxidos.

En *la Figura 8*, se muestran los resultados de las concentraciones de hidroperóxidos (ROOH) en el tejido hepático. Ya que la lipoperoxidación en las membranas biológicas causa, malfuncionamiento de membranas, cambio de fluidez, inactivación de receptores de membrana y enzimas e incremento de permeabilidad no específica a iones como Ca_2^+ .

Los resultados obtenidos nos indican el nivel de peroxidación de las membranas mitocondriales del hígado, en los animales experimentales a las 24 horas después de finalizar el programa de extenuación física.

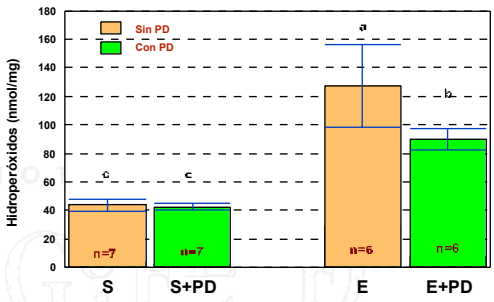


Figura 8. *Concentraciones promedios de hidroperóxido en la membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Se deja en evidencia una alta y significativa (p<0,05) concentración de hidroperóxidos en los dos grupos de ratas extenuadas, siendo mas alta esta concentración en el grupo E, con una concentración promedio de 127,5 nmoles/mg de proteínas en comparación al grupo E+PD que muestra sólo una concentración de 89,6 nmoles/mg de proteínas, en 100 microgramo de muestra de membrana mitocondrial.

No obstante, los grupos de ratas sedentarias dejan en evidencia una homogeneidad en sus valores muéstrales con una tasa de concentración de hidroperóxidos más baja.

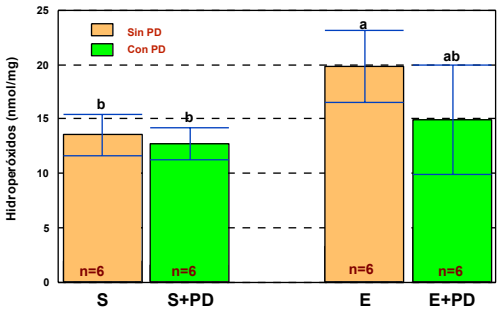


Figura 9. *Concetraciones promedios de hidroperóxidos en la membrana mitocondrial de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Los hallazgos obtenidos en el músculo esquelético, en cuanto a los resultados obtenidos en las concentraciones de hidroperóxidos (ROOH) se muestran en la *Figura 9*. Estos resultados son importantes ya que el aumento de la concentración de los

productos finales de la lipoperoxidación es la más clara evidencia del daño oxidativo.

En esta figura los dos grupos experimentales de extenuación física observaron un incremento importante de las concentraciones de ROOH. El grupo E consignó en su resultado una concentración promedio de hidroperóxidos de 19,8 nmoles/mg de proteínas, seguido por el grupo E+PD con una concentración más baja de 14,9 nmoles/mg de proteínas. No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre ambos grupos.

Evidenciándose además en estas concentraciones de hidroperóxidos de las membranas mitocondriales de los músculos esqueléticos, una homogeneidad de las medias a partir de los subconjuntos de Scheffe con un alfa de 0,05. entre los dos grupos de ratas sedentarias y, el grupo con ejercicio hasta la extenuación con suplemento alimenticio de PD. Quedando de manifiesto que el grupo de ratas extenuadas sin PD observó las concentraciones más alta de ROOH en comparación a todos los otros grupos de animales.

En la *Figura 10*, se muestra el comportamiento de ROOH en el corazón, éstos resultados fueron similares a los acontecidos en los otros dos órganos al obtenerse un incremento en los dos grupos experimentales de ratas con ejercicio hasta la extenuación.

En el grupo E se halló una concentración mayor de los niveles de hidroperóxidos de 14,8 nmoles/mg de proteínas seguido por el incremento del otro grupo de ratas ejercitadas hasta la extenuación con suplemento alimenticio de PD, obteniéndose en este último grupo un promedio de 13,3 nmoles/mg de proteínas. No siendo significativas ($p<0,05$) las diferencias encontradas en esos dos grupos de ratas extenuadas.

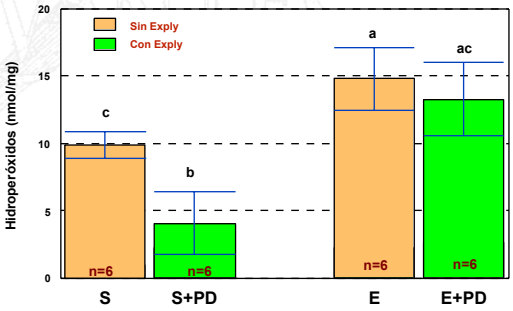


Figura 10. *Concentraciones promedios de hidroperóxidos en la membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05)*

Sin embargo, se sabe que estas elevadas concentraciones de ROOH pueden modificar la organización estructural y funcional de estos organelos por la acción directa de las propias especies reactivas del oxígeno y la acumulación de calcio, limitando la fosforilación oxidativa.

Las diferencias con los grupos de animales sedentarios fueron también establecidas a un intervalo de confianza de un 95%. Observando ambos grupos de

ratas sedentarias los niveles más bajos de concentración de ROOH. Pero a la vez, una aumentada y significativa concentración de este biomarcador de peroxidación lipídica en los animales sedentarios sin ingesta suplementaria de PD.

4.4.2. Concentraciones de TBARS

En los gráficos siguientes, se muestran los resultados obtenidos en el hígado en uno de los productos finales de la peroxidación lipídica. Donde se deja en evidencia la incrementada presencia de los radicales libres inducido por el ejercicio físico extenuante.

Los hallazgos encontrados en este órgano por las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR), se ilustran en la *Figura 11*. Dejando en evidencia un significativo incremento ($p<0,05$) en las concentraciones de TBAR en el tejido hepático en el grupo de ratas agotadas hasta la extenuación sin PD.

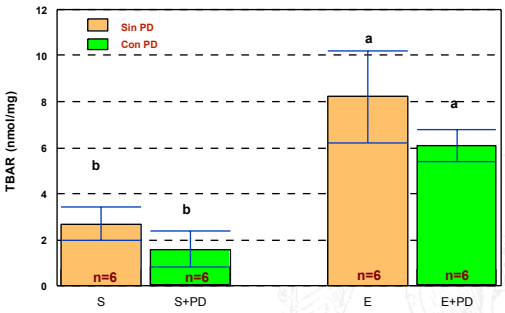


Figura 11. *Concentraciones de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR) en la membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

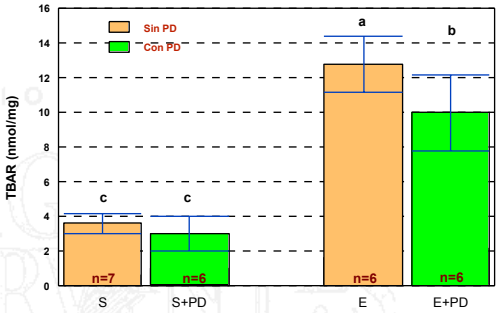


Figura 12. *Concentraciones de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR) en la membrana mitocondrial de músculo esquelético (p<0,05).*

La detección de los productos finales de la peroxidación, es la evidencia más frecuente del papel de los radicales libres en el daño oxidativo a los tejidos En estos animales extenuados sin PD, se consignan los valores más altos de estas concentraciones, con un valor de 8,22 nmol/mg de proteínas en 100 microlitros de muestra, seguido por el grupo experimental de animales con ejercicio intenso y PD, quienes observan en estos resultados una concentración más baja de 6,15 nmol/mg de proteínas.

Las concentraciones más homogéneas de TBAR obtenidas en las membranas mitocondriales de hígado fueron en los grupos de animales sedentarios, con un valor de 1,65 nmol/mg en el grupo S+PD y 2,75 nmol/mg en el grupo S.

En la *Figura 12* se muestran los resultados obtenidos en las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR), de los tejidos de los músculos esqueléticos en los cuatro grupos de animales en comparación.

No obstante, a que muchos ensayos han medido la lipoperoxidación, pero ninguno al parecer es un buen medidor de todo el proceso en conjunto, aquí la aplicación de ensayos de TBAR se correlacionaron positivamente con los resultados obtenidos en los hidroperóxidos (ROOH) de membrana muscular.

Se obtuvo en la prueba de homogeneidad de las medias valores similares para esta variable entre ambos grupos de ratas sedentarias. Consignando el grupo S+PD una concentración de 3,0 nmol/mg proteínas y, el grupo S una concentración de 3,6 nmol/mg de proteínas en el tejido muscular.

Las ratas extenuadas sin ingesta de PD (E) observaron la mayor concentración promedio de TBAR de 12,8 nmol/mg en comparación con las del grupo E+PD, que sólo consignaron una concentración de 10 nmol/mg de proteínas. Quedando en evidencia en estos resultados un significativo incremento ($p<0,05$) de las concentraciones de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, entre los grupos de ratas ejercitadas exhaustivamente en comparación a los grupos de animales sedentarios.

También fue significativo dicho aumento en las concentraciones de TBAR en el grupo de animales ejercitados exhaustivamente sin PD, en comparación a sus pares extenuadas con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanun,*

Las concentraciones de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico obtenidas en el corazón se ilustran en la *Figura 13* El valor significativamente más alto ($p<0,05$) fue hallado en las concentraciones de TBAR en el grupo E, con una tasa promedio de 18,2 nmol/mg de proteínas de membrana mitocondrial en comparación al valor más bajo de 11,7 nmol/mg en las ratas extenuadas con ingesta suplementaria de PD.

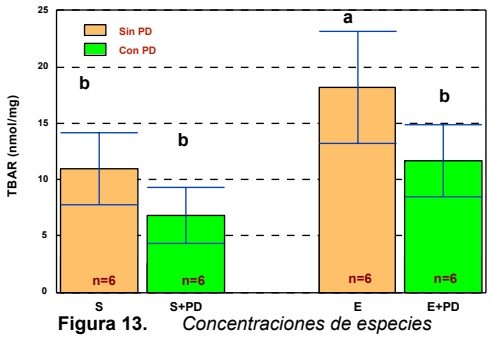


Figura 13. *Concentraciones de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR) en la membrana mitocondrial de corazón (p<0,05).*

La importancia de estos resultados se basan en que, la oxidación radicálica de los lípidos de membrana y transconformaciones en las proteínas se han señalados como las principales modificaciones en la relación estructura-función de las membranas celulares como expresión del daño celular oxidativo.

Las concentraciones de TBAR entre los animales del grupo E+PD y ambos grupos de ratas sedentarias, evidenciaron homogeneidad entre sus medias muéstrales a un intervalo de confianza de un 95%.

4.5. CONCENTRACIONES DE ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS EN PLASMA

4.5.1. Tocoferol (VE)

También fueron estudiados los antioxidantes plasmáticos en este estudio. Ya que el plasma contiene proteínas propias de la sangre y otras sustancias alimenticias, como glucosa, aminoácidos, lípidos, sales minerales, hormonas y las vitaminas que son transportada hasta las células, retirando además los productos sobrantes de las reacciones que se producen en éstas.

Una de estas vitaminas estudiada fue la vitamina E, las concentraciones de tocoferol obtenidas en el plasma, se ilustran en *la Figura 14*. En esta figura, se observa una mayor y significativa ($p<0,05$) diferencia de las concentraciones de esta vitamina antioxidante en el plasma, en ambos grupos de animales sedentarios, en comparación a los dos grupos de ratas extenuadas físicamente.

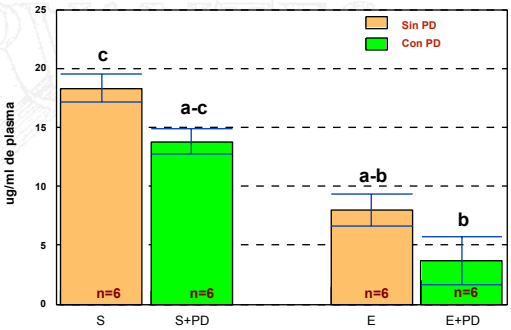


Figura 14. *Concentraciones promedios de tocoferol (VE) plasmático en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Las diferencias más importantes fueron halladas entre las mayores concentraciones de VE obtenidas en el grupo de ratas sedentarias (S) con 18,3 µg/ml de plasma y las mínimas obtenidas en el grupo S+PD, de 3,7 µg/ml de plasma en el grupo de animales con ejercicio y suplemento alimenticio de PD. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias importantes en las concentraciones de tocoferol entre los animales ejercitados sin PD (E) y los sedentarios (S+PD).

4.5.2. Retinol (VA)

Otra vitamina estudiada fue la VA que no obstante, a la poca variación de las concentraciones de retinol en membrana mitocondrial del corazón, en el plasma, se evidenciaron diferencias entre los promedios muéstrales en los cuatro grupos de animales.

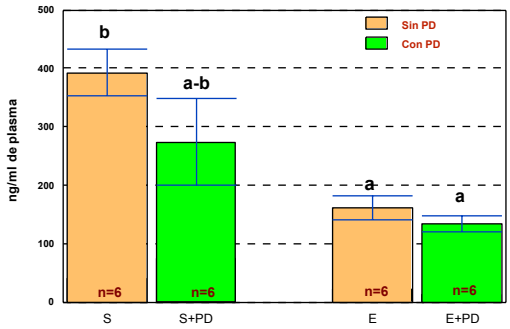


Figura 15. *Concentraciones promedios de retinol (VA) plasmático en los cuatro grupos de animales (p<0,05)*

En la *Figura 15*, se observa una mayor cantidad de retinol plasmático en los grupos de animales sedentarios en comparación a los dos grupos de ratas extenuadas, siendo homogéneas las concentraciones de VA en ambos grupos entre sí.

La concentración de retinol significativamente (p<0,05) más alta obtenida fue de 392,7 ng/ml de plasma en el grupo de animales sedentarios, y de 134,3 ng/ml en el grupo de ratas extenuadas con *Phlebodium decumanum*.

Quedando en evidencia en estos resultados una homogeneidad de las medias muéstrales entre los dos grupos de ratas sedentarias y el grupo de animales ejercitados exhaustivamente hasta el agotamiento sin PD.

4.5.3. Coenzima Q_9 (CoQ_9)

En las concentraciones de CoQ_9 en el plasma no se hallaron diferencias estadísticas (p<0,05) entre los cuatro grupos de animales como se ilustra en la *Figura 16.* Sin embargo, los niveles de concentración de éste antioxidante fue ligeramente mayor en los dos grupos de animales sedentarios en comparación a los dos grupos de ratas con ejercicio hasta la extenuación.

No obstante, la ubiquinona ha demostrado ser el primer antioxidante que se consume cuando el plasma es sometido a un estrés oxidativo in vitro, cumple un papel importante en prevenir la iniciación o propagación de la peroxidación lipídica en el plasma y en las lipoproteínas de membrana.

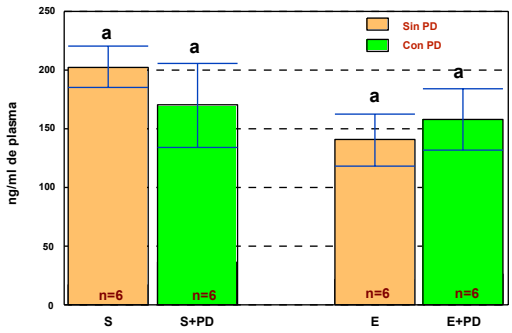


Figura 16. *Concentraciones promedios de CoQ9 en plasma en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Los valores de dichas concentraciones fluctuaron entre el máximo alcanzado de 202,3 ng/ml de

plasma obtenido en el grupo de ratas sedentarias sin PD (E) y el mínimo de 140,3 ng/ml obtenido en el grupo de animales extenuados físicamente sin suplemento alimenticio de PD. Siendo homogéneas dichas concentraciones en los cuatro grupos de animales.

4.6. CONCENTRACIÓN DE ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICOS EN MEMBRANA MITOCONDRIAL.

4.6.1. Tocoferol (VE)

La vitamina E es el término usado para referirse a un conjunto de 8 nutrientes solubles en grasa. La capacidad antioxidante de esta vitamina le viene proporcionada por su naturaleza química de su cabeza cromanol, más concretamente por el grupo OH- en posición de 6 anillos fenólicos. Durante muchos años, el alfa tocoferol ha sido considerado como el antioxidante capaz de romper la cadena de peroxidación lipídica más importante con que cuenta el organismo animal para luchar contra los efectos deletéreos de las especies reactivas del oxígeno.

La vitamina E (tocoferol) es un potente antioxidante por sí solo, sus efectos son amplificados cuando actúa armoniosamente con otros antioxidantes. Los resultados de sus concentraciones en las membranas mitocondriales del hígado se ilustran en la *Figura 17*. Se observa en dichos resultados homogeneidad entre las medias muéstrales de sus concentraciones en los cuatro grupos de animales.

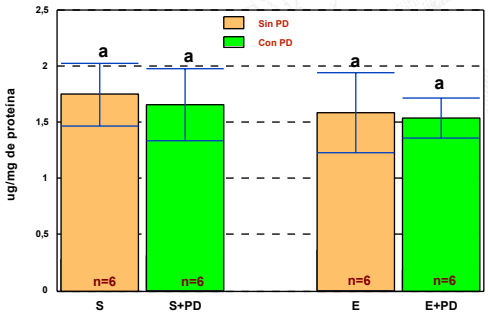


Figura 17. *Concentraciones promedios de tocoferol (VE) en membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

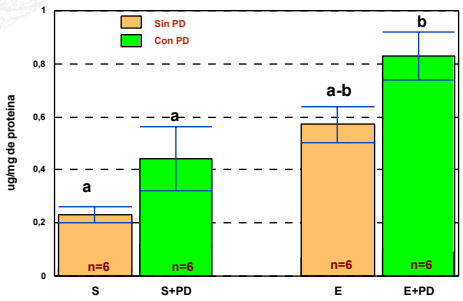


Figura 18. *Concentraciones promedios (ug/mg de proteínas) de tocoferol (VE) en membrana mitocondrial de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Se evidencia en este gráfico un ligero aumento de las concentraciones de VE en los dos grupos de ratas sedentarias en comparación a las extenuadas físicamente. Los niveles de dichas concentraciones fluctuaron entre, el máximo obtenido de 1,75 µg/mg de proteínas en el grupo de ratas sedentarias sin PD (S), y la mínima concentración de tocoferol de 1,54 µg/mg de proteínas de hígado, obtenida en el

grupo de animales ejercitados hasta la extenuación con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum.*

Las concentraciones de tocoferol obtenidas en las membranas mitocondriales del músculo esquelético se muestran en la *Figura 18.*

Aparte, de sus propiedades antioxidativas, la VE es importante para curar y reparar los tejidos dañados y reducir el tamaño de las cicatrices. En esta gráfica se observa un incremento significativo ($p<0,05$) de 0,83 µg/mg de proteínas del contenido de vitamina E (VE) en el grupo de animales con ejercicio extenuante y con ingesta suplementaria de PD, en comparación a los dos grupos de animales sedentarios.

El grupo de animales extenuados físicamente (E) evidenció una menor concentración de tocoferol, con una concentración promedio de 0,57 µg/mg de proteínas. de la membrana mitocondrial del músculo. No siendo esta concentración estadísticamente diferente con ambos grupos de animales sedentarios y con el grupo E+PD.

La VE es un protector antioxidativo crucial contra la sobrecarga oxidativa, particularmente la peroxidación lipídica, de las membranas celulares y del endotelio. No obstante, a los resultados anteriores la diferencia de los promedios de las concentraciones de VE entre los animales extenuados con PD, y los animales del grupo E fueron estadísticamente significativos ($p<0,05$) cuando fueron expresados por gramos de órgano, tal como queda demostrado en la *Figura 19.*

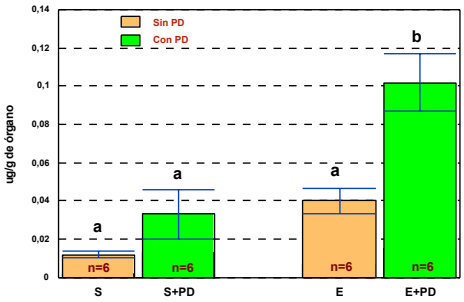


Figura 19. *Concentraciones promedios (ug/gr de órgano) de tocoferol (VE) en membrana mitocondrial de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales ($p<0,05$).*

La concentración más alta y significativa de tocoferol fue obtenida en el grupo E+PD con 0,10 µg/g de órgano, y de solo 0,04 µg/g de músculo en el grupo E. No siendo ésta última concentración significativa, con las obtenidas en los grupos de animales sedentarios con o sin ingesta de *Phlebodium decumanum.* La menor concentración de esta vitamina antioxidante fue obtenida en el grupo de ratas sedentarias sin suplemento alimenticio de PD, con un valor promedio en su concentración de 0,01µg/g de músculo esquelético.

Los resultados de las concentraciones del tocoferol principal antioxidante en la membrana mitocondrial, que puede interrumpir la reacción de la peroxidación lipídica en la membrana celular, en este caso del corazón**,** sus resultados se muestran en la *Figura 20.*

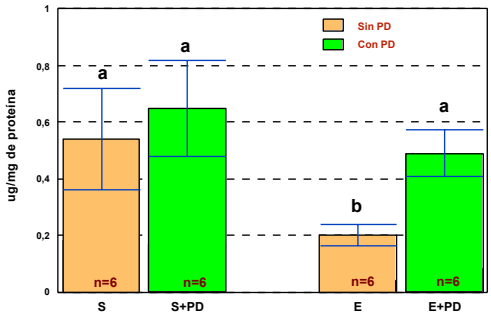


Figura 20. *Concentraciones promedios de tocoferol (VE) en membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

En esta gráfica se aprecia homogeneidad de las altas concentraciones encontrada entre los grupos de animales sedentarios y el grupo de ratas extenuadas con suplemento alimenticio de PD.

No obstante, a esta homogeneidad de las concentraciones de VE se evidenció una disminución significativa en las concentraciones de tocoferol en los grupos de ratas extenuadas, siendo estadísticamente mayor esta disminución en comparación a los animales con ingesta suplementaria de *Phlebodiun decumanum* en las ratas extenuadas físicamente sin PD.

La tasa más alta encontrada de estas concentraciones fue de 0,65 µg/mg de proteínas en el grupo de ratas sedentarias con suplemento alimenticio de PD (S+PD) y, la más baja fue de 0,20 µg/mg de proteínas de membrana mitocondrial en el tejido hepático, de las ratas del grupo E.

4.6.2. Retinol (VA)

La VA participa en algunas funciones relacionadas con la actividad del sistema inmunológico como son la estabilización de las membranas celulares y la captación de radicales libres. El déficit de retinol se asocia con atrofia del timo, la disminución de la proliferación linfocitaria en respuesta a mitógenos, aumento de la capacidad de unión de las bacterias a las células epiteliales respiratorias y alteración de la secreción de IgA.

Esta vitamina lipídica soluble localizada fundamentalmente en las membranas celulares, sus resultados encontrados en este estudio en el tejido hepático se muestran en la *Figura 21***.**

En esta figura se evidencia homogeneidad en las medias muéstrales de retinol en todos los grupos de ratas comparadas entre sí. Observándose unas concentraciones de retinol que fluctúan entre el máximo obtenido de 38,4 ng/mg de

proteínas en el grupo de ratas con suplemento alimenticio de PD y la concentración más baja de 26,4 ng/mg de proteínas en la membrana mitocondrial de hígado.

El retinol (VA) lleva a cabo varias labores importantes, especialmente como protector de las membranas celulares y tejidos adiposos. Los resultados obtenidos en su nivele de concentración en el músculo esquelético se muestran en la *Figura 22*.

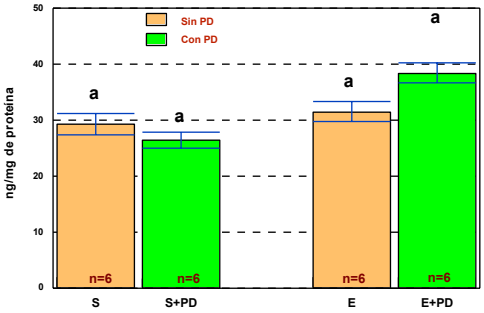


Figura 21. *Concentraciones promedios de retinol (VA) en membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

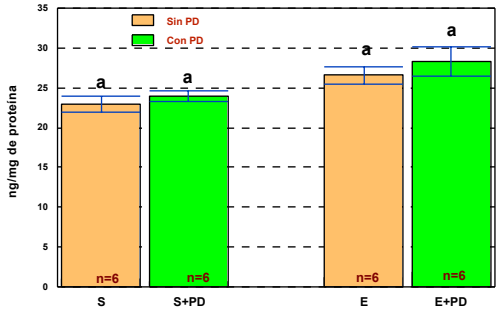


Figura 22. *Concentraciones promedios (ng/mg de proteína) de retinol (VA) en membrana mitocondrial de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

En él se observa homogeneidad en las medias muéstrales en los cuatro grupos de animales con o sin ingesta suplementaria de PD. Las concentraciones de VA fluctuaron entre el valor más alto obtenido de 26,6 ng/mg de proteínas en el grupo E+PD, y la menor concentración obtenida en el grupo de ratas sedentarias sin PD con un valor de 23,0 ng/mg de proteínas en la mitocondria del músculo.

No obstante, a la homogeneidad de las concentraciones de retinol encontradas en el músculo esquelético cuando fueron expresadas en ng/mg de proteínas, estas fueron estadísticamente diferentes al expresarse en gramo de órgano, como se ilustra en la *Figura 23*.

Esto es importante ya que la VA como potente antioxidante, neutraliza los radicales libres, contribuyendo a reparar los daños y, si se iniciase una infección, ayudaría al sistema inmunitario a contrarrestarla.

Los niveles de concentración mas altos fueron hallados en ambos grupos de animales extenuados, siendo ligeramente mayor en los animales con ingesta suplementaria de PD. Este último grupo E+PD observó

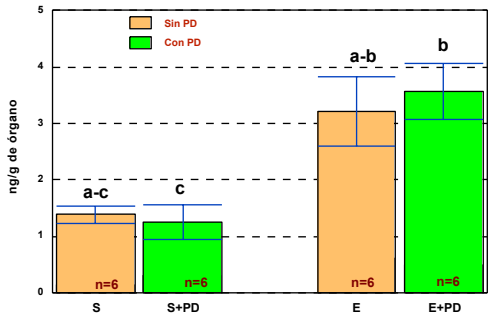


Figura 23. *Concentraciones promedios (ng/g de órgano) de retinol (VA) en membrana mitocondrial de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

una elevada y significativa (p<0,05) concentración de VA en la mitocondria del músculo esquelético, con una tasa de 3,5 ng/g de órgano en comparación a los dos grupos de animales sedentarios.

La segunda más alta concentración correspondió a los animales extenuados sin PD, siendo esta diferencia, estadísticamente significativa con las concentraciones obtenidas en el grupo de ratas sedentarias con PD.

La menor concentración de retinol fue hallada en las membranas mitocondriales de los animales sedentarios con ingesta suplementaria de PD, con un valor de 1,25 ng/g de órgano. Observándose homogeneidad en las concentraciones de VA entre ambos grupos de ratas sedentarias y ambos grupos de animales extenuados.

También este antioxidante no enzimático fue estudiado en el corazón**.** En los resultados encontrados tampoco la VA observó diferencias en los promedios muéstrales en sus concentraciones. En la *Figura 24* se ilustran los resultados obtenidos en los dos grupos de animales sometidos a ejercicio exhaustivo y los dos grupos de ratas sedentarias, apreciándose homogeneidad en sus medias muéstrales.

La fluctuación de estas concentraciones osciló entre el máximo obtenido de 41,3 ng/mg de proteínas consignado en el grupo de ratas ejercitadas con PD, y el mínimo de 35,1 ng/mg de proteínas obtenidas en los grupos de animales extenuados físicamente sin *Phebodium decumanum.*

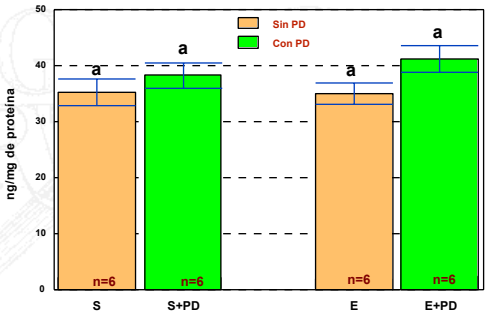


Figura 24. *Concentraciones promedios de retinol (VA) en membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

4.6.3. Coenzima Q_9 (CoQ_9)

Además de su papel como trasportador de electrones, la coenzima Q tiene un importante protagonismo como antioxidante de membrana, papel éste último que ha ido ganando importancia en los últimos años, como lo demuestra el gran número de estudios realizados in *vivo e in vitro* a muy diferentes niveles, tales como en vesículas de fosfolípidos, membranas reconstituidas, partículas submitocondriales, mitocondrias, microsomas, células intactas, animales intactos, así como también observaciones a nivel clínico.

En la *Figura 25*, se observa variabilidad en los resultados obtenidos en las concentraciones de coenzima (CoQ_9) en las mitocondrias del hígado entre los cuatro grupos de animales. Esta variabilidad de las concentraciones de CoQ_9 está dada por las diferencias que se observan, entre los dos grupos de ratas sedentarias versus los animales sometidos a ejercicio exhaustivo.

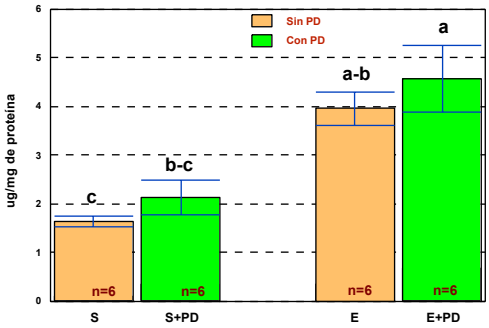


Figura 25. *Concentraciones promedios de CoQ9 en membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Se registra una significativa (p<0,05) diferencia en la concentración más alta obtenida de 4,5 µg/mg de proteínas en el grupo E+PD en comparación a los dos grupos de animales sedentarios.

También se muestra diferencias significativas en los grupos de animales extenuados sin PD, con una concentración mayor de 3,9 µg/mg de proteínas de membrana mitocondrial de hígado con respecto a los animales sedentarios sin PD (S), quienes consignaron unas concentraciones de CoQ_9 de sólo 1,6 µg/mg de proteínas. No obstante, fueron homogéneas las diferencias encontradas en estas concentraciones en los grupos de ratas extenuadas y sedentarias entre sí.

Las concentraciones de CoQ_9 en las mitocondrias de los músculos esqueléticos de ratas se muestran en la *Figura 26.* En el caso de los humanos es la CoQ_{10} es la responsable de la energía celular por dos razones distintas, en primer lugar, ayuda a crear al menos tres de las enzimas que la célula utiliza para crear ATP, el combustible que se fabrica en las mitocondrias y que una vez liberado se consume y aporta energía. La COQ_{10} también genera energía directamente, desempeñando un papel en la transferencia de electrones y protones cuando la energía pasa a través de las paredes mitocondriales y celulares.

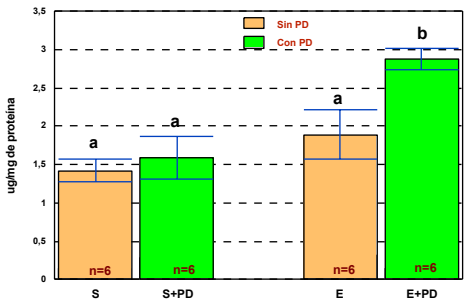


Figura 26. *Concentraciones promedios (ug/mg de proteína) de CoQ9 en membrana mitocondrial de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

En este gráfico se observa una elevada concentración de esta coenzima Q_9 en los dos grupos de animales extenuados físicamente en comparación a sus pares sedentarios.

El grupo de ejercicio hasta la extenuación (E+PD) observó una significativa ($p<0,05$) diferencia de dichas concentraciones, con un valor promedio de CoQ_9 de 2,8 µg/mg de proteínas en comparación a los valores más bajos obtenidos en los dos grupos de ratas sedentarias y los animales extenuados sin PD. No encontrándose diferencias importantes en los promedios muéstrales de ambos grupos de ratas sedentarias y el grupo de ratas extenuadas físicamente (E) .

Sin embargo, se encontró una diferencia estadística ($p<0,05$) entre el grupo E y las mayores concentraciones de CoQ_9 obtenidas en el grupo de ratas extenuadas con suplemento de *Phlebodium decumanum.*

Parecidas fueron las diferencias halladas en las concentraciones de CoQ_9 cuando éstas fueron expresadas en µg/g de músculo, cuyos resultados se muestran en la *Figura 27.* Aquí también las diferencias de las altas concentraciones promedios de ésta enzima en los músculos de los animales extenuados con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum,* fueron estadísticamente diferentes a las menores concentraciones de CoQ_9 obtenidas en ambos grupos de ratas sedentarias y animales extenuados sin PD. No siendo diferentes las concentraciones obtenidas en el grupo E con los grupos de ratas sedentarias.

Estos resultados son importantes ya que la ubiquinona (CoQ_{10}) es el colector de la mayoría de los electrones provenientes de los procesos oxidativos celulares, siendo transferidos los electrones a la ubiquinona por una serie de flavoproteínas dehidrogenasa.

Este antioxidante protector contra lesiones celulares causadas por la hiperactividad de radicales libres, y constituyente importante de la cadena de transporte de electrones como transportador de electrones entre las flavinas coenzimas y el citocromo b en la membrana interna mitocondrial durante la fosforilación oxidativa, también fue estudiado en el corazón.

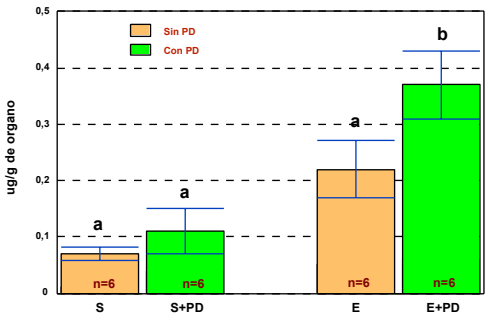


Figura 27. *Concentraciones promedios (ug/g de órgano) de CoQ9 en membrana mitocondrial de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

En la *Figura 28,* se observa las concentraciones de CoQ_9 en la membrana

interna de la mitocondria del tejido miocárdico. Se aprecian diferencias significativas en sus concentraciones en los cuatro grupos de animales.

El valor más bajo de CoQ_9 de 3,8 µg/mg de proteínas fue obtenido en los animales ejercitados físicamente de manera exhaustiva sin PD, y el más alto de 6,8 µg/mg de proteínas en los animales sedentarios con *Phlebodium decumanum,* siendo significativa estadísticamente esta diferencia.

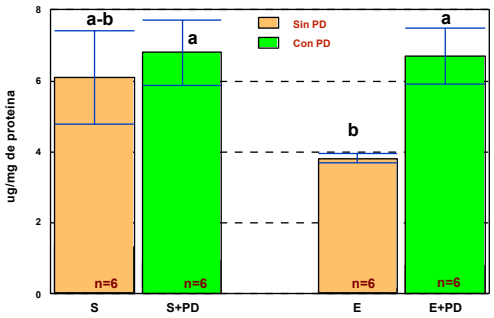


Figura 28. *Concentraciones promedios de CoQ9 en membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

4.7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CITOPLASMÁTICA

4.7.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Existen dos tipos de antioxidantes fisiológicos, presentes en los tejidos, que pueden actuar en el espacio intracelular y en el extracelular y se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. Sus acciones van encaminadas a reducir la toxicidad de los radicales libres y entre ellas se encuentran la conversión de éstos en moléculas menos activa y el evitar la transformación de radicales libres pocos activos en forma más nocivas.

Este sistema antioxidante está basado en un complejo enzimático de defensa que incluye a la Superóxido dismutasa (SOD) la que permite la disminución del ión superóxido en peróxido de hidrógeno. Este antioxidante enzimático fue medido su actividad en el citoplasma del tejido hepático, y su resultado se ilustra en la *Figura 29.*

Se evidencia en esta figura una aumentada actividad de esta enzima en los animales ejercitados exhaustivamente sin PD, después de las 24 horas del último episodio de esfuerzo intenso. El valor más alto de actividad obtenido fue de 17,6 U/mg de proteínas en citosol de hígado, en el grupo de ratas extenuadas sin PD.

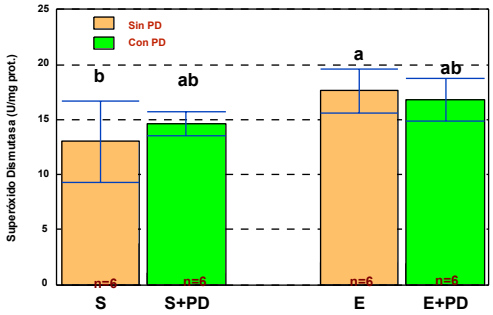


Figura 29. *Actividad enzimática promedio de la Superóxido dismutasa en citosol de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

La eliminación del exceso de superóxido por SOD es una magnífica defensa antioxidante en organismos aeróbicos, aunque mucha actividad SOD en condiciones normales en relación a la actividad de enzimas eliminadoras de H_2O_2 tales como catalasa y glutation peroxidasa**,** podría convertirla en perjudicial**.**

La incrementada actividad de esta enzima en el grupo E es significativa ($p<0,05$) con la encontrada en los animales sedentarios sin ingesta suplementaria de PD, quienes registraron valores de actividad enzimática de 13,0 U/mg de proteínas. Existiendo una homogeneidad de las medias entre ambos grupos de animales extenuados y el grupo E+PD.

También fue medida esta enzimática antioxidante en los tejidos del músculo esquelético, su importancia radica en que la superóxido dismutasa (SOD) es la encargada de neutralizar la acción del radical superóxido, descomponiéndolo y creando peróxido de hidrógeno y oxígeno. En este estudio fue medida en el citoplasma del músculo esquelético, cuyos resultados se ilustran en la *Figura 30.*

Los resultados encontrados dejan en evidencian una actividad para esta enzima homogénea, con ligeros incrementos de su actividad a las 24 horas del último episodio de extenuación física, en los grupos de animales extenuados físicamente. Registrando el grupo E+PD el valor más alto de actividad de 17,2 U/mg en 100 microgramos de proteínas de citosol en músculo. El valor mas bajo hallado en la actividad enzimática de la SOD en los cuatro grupos de animales fue en el grupo de ratas sedentarias con suplemento de PD, con un valor de 11,9 U/mg de proteínas.

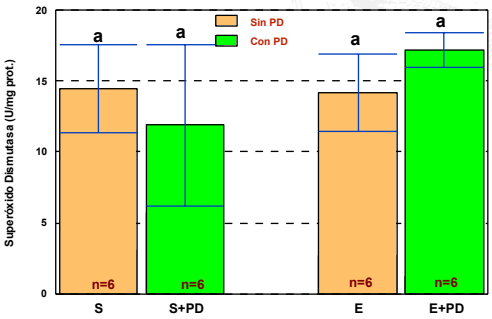


Figura 30. *Actividad enzimática promedio de la Superóxido dismutasa en citosol de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

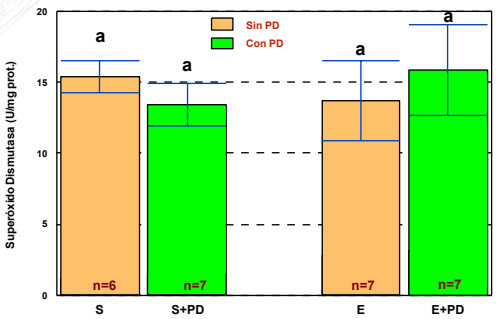


Figura 31. *Actividad enzimática promedio de la Superóxido dismutasa en citosol de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

La homogeneidad de los valores encontrados en la actividad de esta enzima en el músculo esquelético fue obtenida a un nivel de confianza de un 95%.

La actividad enzimática de la superóxido dismutasa en el corazón se ilustra en la *Figura 31,* donde los promedios muéstrales de su actividad son similares en todos los grupos de animales a un mismo intervalo de confianza.

La actividad enzimática más incrementada se obtuvo también en las ratas extenuadas con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum,* con valores promedios de 15,9 U/mg de proteínas de citosol de tejido miocárdico. No obstante, a que la actividad mas baja obtenida fue en el grupo de ratas sedentarias con ingesta suplementaria de PD, consignando una actividad de 13,4 U/mg de proteínas.

4.7.2. Catalasa (CAT)

La catalasa se encuentra presente en la mayoría de las células aeróbicas. En los tejidos humanos se localiza en los peroxisomas, citosol y mitocondrias, cumple un papel importante como antioxidante. Protege a las células de la acumulación de peroxido de hidrógeno dismutándolo para formar H_2O y O_2**,** o bien usándolo como un oxidante, en cuyo caso se comporta como una peroxidasa.

En el citoplasma del hígado la actividad enzimática de la catalasa (CAT) no se alcanzó a obtener diferencias significativas entre todos los grupos de comparación. Consignándose una homogeneidad en la actividad de las medias muéstrales de dicha enzima en todos los grupos de animales, tal como se ilustra en la *Figura 32.*

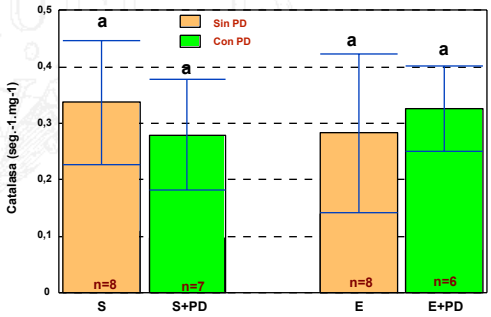


Figura 32. *Actividad enzimática de la catalasa (CAT) citoplasmática de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Esta enzima no puede metabolizar el peróxido lipídico de la célula, que crean los radicales libres y que se encuentran en la pared o adherido a otros ácidos grasos de la célula. Sólo puede atacar al peróxido que flota libremente en la zona hidrosoluble.

La actividad promedio mas elevada se consignó en los grupos de animales con ejercicio hasta la extenuación y PD, con una actividad de 0,32 seg-1mg-1 y el grupo de animales sedentarios sin PD con 0,33seg-1mg-1, no siendo esta actividad enzimática importante a un intervalo de confianza de un 95%.

Los resultados obtenidos en la actividad de la catalasa (CAT) del músculo esquelético, cuya actividad ayuda a eliminar el peróxido de hidrógeno que se introduce en los tejidos, se ilustran en la *Figura 33.*

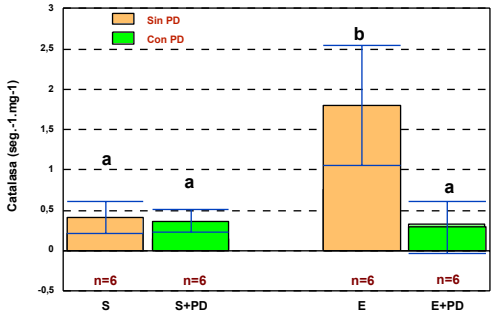


Figura 33. *Actividad enzimática promedio de la catalasa (CAT) citoplasmática en el músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

En ésta figura se observa el valor más altos encontrado de esta actividad en los animales del grupo E, de ratas con ejercicio intenso sin ingesta suplementaria de PD. Su incrementada actividad fue de un valor promedio 1,83 seg.-1mg-1 en 2 microlitros de muestra de tejido muscular.

Sin embargo, el valor promedio mas bajo obtenido en el citoplasma fue de 0.29 seg-1mg-1 y se encontró en el grupo de animales extenuados con suplemento alimenticio de PD (E+PD). Siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p<0,05) entre ambos grupos de animales. Los otros grupos de ratas sedentarias observaron poca variabilidad en la actividad media de esta enzima, siendo homogéneos sus resultados entre ellos y con respecto al grupo E+PD.

Los resultados encontrados en el corazón se ilustran en la *Figura 34.* tampoco se observó fluctuaciones importantes de la actividad de esta enzima.(CAT). Ya que al aplicar un ANOVA con un alfa de 0,05 se encontró una homogeneidad entre las medias muéstrales. Lo que deja en evidencia una actividad similar para esta enzima en todos los grupos experimentales como controles, con o sin ejercicio y suplemento alimenticio de PD.

La mayor actividad registrada de 0,84 seg-1mg-1 fue consignada en el grupo de animales con ejercicio exhaustivo e ingesta de PD y, el menor valor encontrado fue de 0,60 seg-1mg-1 en las ratas sedentarias sin suplemento alimenticio de PD. No obstante, ambos valores son homogéneos a un nivel de significancia de p<0,05.

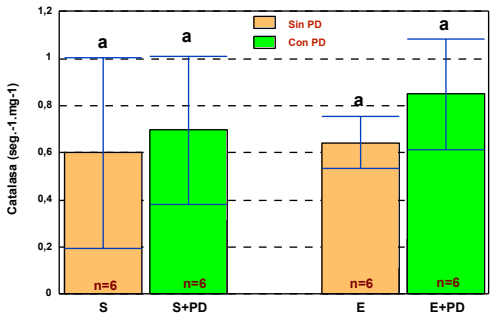


Figura 34. *Actividad enzimática promedio de la catalasa (CAT) citoplasmática de corazón en los cuatro grupos animales (p<0,05).*

4.7.3. Glutation peroxidasa (GPX)

Su importancia radica en que es uno de los sistemas antioxidantes de la glutation peroxidasa/glutation reductasa. La glutation reductasa es una flavoenzima dependiente del nicotinamín adenín dinucleótidofosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutation oxidado a glutation reducido el cual es utilizado por la glutation peroxidasa para la reducción del peroxido de hidrógeno y de los lipoperóxidos, los cuales son elementos toxicos. Teniendo un efecto de pivoteo en el estrés oxidativo.

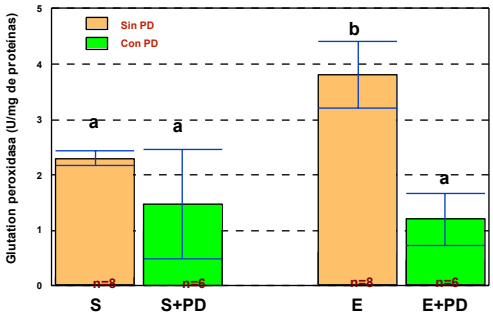


Figura 35. *Actividad enzimática promedio de la Glutatión peroxidasa (GPX) en citosol de hígado en los cuatro grupos animales (p<0,05).*

La actividad de la GPX del tejido hepático se muestra en la *Figura 35*. En esta figura se evidenciaron cambios importantes de la actividad de esta enzima entre los diferentes grupos de ratas.

Se observa una actividad significativamente incrementada (p<0,05) en el grupo E, el. valor máximo alcanzado fue de 3,81 U/mg de proteínas citoplasmática de hígado en aquel grupo de animales sometido a un modelo de ejercitación hasta la extenuación sin ingesta de PD.

La importancia de estos hallazgos radica en que esta enzima tiene la propiedad de eliminar el peróxido formado por los ácidos grasos de las membranas, lo que permite la reparación de la membrana celular. Sin embargo, la actividad de esta enzima fue homogénea entre los otros dos grupos de animales sedentarios y las ratas extenuadas con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum*.

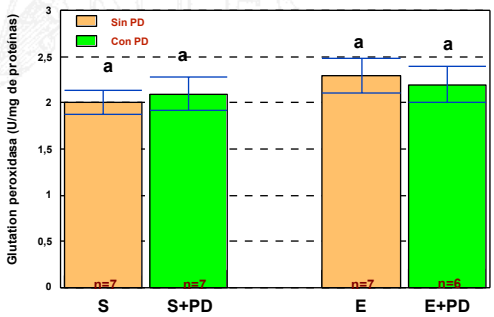


Figura 36. *Actividad enzimática promedio de la Glutation peroxidasa (GPX) en citosol de músculo esquelético en los cuatro grupos animales (p<0,05).*

En la *Figura 36,* se presentan los resultados encontrados de la actividad enzimática de la glutation peroxidasa (GPX) del músculo esquelético *vastus lateralis*.

Enzima que tiene por función convertir el peróxido de hidrógeno en agua, tendiendo a metabolizar aquellas moléculas que la catalasa no ha atacado.

En estos resultados no se observaron cambios importantes en la actividad de dicha enzima, en los cuatro grupos de animales a las 24 horas post-ejercicio.

La actividad mas elevada obtenida fue en el grupo de ratas con ejercicio sin suplemento alimenticio de PD, con una actividad de 2,38 U/mg en 100 microgramos de proteínas en el citoplasma del músculo esquelético. El mínimo encontrado correspondió al grupo de ratas sedentarias sin ingesta de PD, con un valor de 2,06 U/mg de proteínas. Siendo todos los valores obtenidos homogéneos para la actividad de dicha enzima.

A diferencia de los resultados encontrados en la actividad enzimática de la GPX en los otros dos órganos, en el corazón como se muestra en la *Figura 37* se evidenció, una disminuida y significativa ($p<0,05$) actividad de esta enzima en aquellos animales extenuados sin *Phlebodium decumanum* con un valor de 0.12 U/mg de proteína citoplasmática de tejido miocárdico.

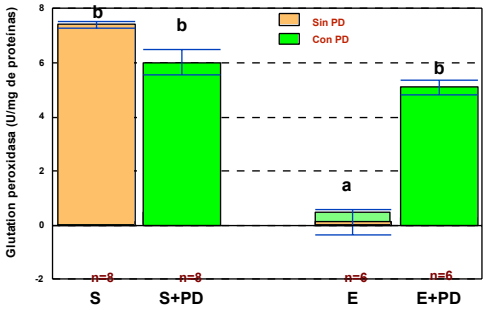


Figura 37. *Actividad enzimática promedio de la Glutation peroxidasa (GPX) en citosol de corazón en los cuatro grupos de animales ($p<0,05$).*

La actividad más alta obtenida en esta enzima fue de 7,40 U/mg de proteínas consignada en el grupo de ratas sedentarias sin PD. Los dos grupos de animales sedentarios evidenciaron una respuesta similar en la actividad de esta enzima con respecto a las extenuadas con *Phlebodium decumanum* a un intervalo de confianza de un 95%.

4.8. FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

En la oxidación aeróbica, en el interior de la mitocondria a partir de NADH y de otros substratos los electrones no son cedidos directamente al oxígeno lo que produciría una reacción explosiva con una gran liberación puntual de energía. Por el contrario, los electrones llegan al oxígeno a través. de una cadena de transportadores con valores crecientes de potencial redox para liberar gradualmente energía de oxidación, éste paso gradual permite la conservación de energía en moléculas de ATP

Los organismos que requieren oxígeno en sus funciones de generación de energía poseen diversos citocromos que están implicados en el sistema de transferencia de electrones. Los citocromos son una clase de proteínas

caracterizadas por la presencia de un grupo hemo que contiene hierro unido covalentemente a la proteína. Su estado es alternado de oxidado a reducido en la transferencia de electrones hacia el oxígeno, en la cadena de transporte electrónico.

4.8.1. Citocromos a+a_3

Tal como se ha dicho anteriormente, la cadena de transporte de electrones está constituida por varios componentes, uno de ellos, que hemos medido en este estudio es el citocromos a+a_3 de la membrana mitocondrial del hígado, sus resultados se ilustra en la *Figura 38.*

En esta figura se observa homogeneidad en las medias de éstos citocromos en los cuatro grupos de animales, los valores porcentuales más altos encontrados se observan en los grupos de animales extenuados versus las ratas sedentarias. Fluctuando esta homogeneidad en las cantidades máximas obtenidas de citocromos a+a_3 en el grupo E+PD, con 0,17 nmol/mg y el mínimo de 0,10 nmol/mg de proteínas de hígado en el grupo de ratas sedentarias sin ingesta suplementaria de PD.

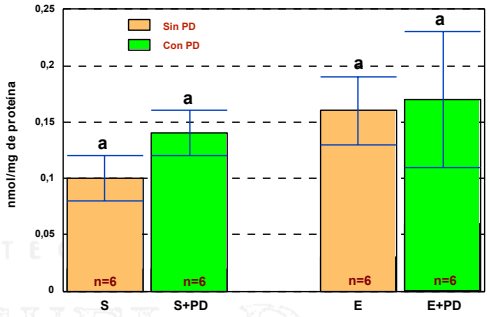


Figura 38. *Cantidad promedio de citocromos a+a3 en la membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05)*

Los resultados de la cantidad de citocromos (a+a_3) de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna del músculo esquelético se muestran en la *Figura 39.*

Su importancia es que, el citocromos a+a_3 es el único dador de electrones al oxígeno. La estructura de la membrana es importante ya que permite fijar los componentes de la cadena respiratoria en un ordenamiento secuencial que facilita la transferencia de electrones entre ellos, lo que determina una alta velocidad y eficiencia del sistema para la conversión de energía.

En este gráfico queda en evidencia un ligero aumento en la cantidad de citocromos en los dos grupos de ratas extenuadas físicamente en comparación a los dos grupos de ratas sedentarias. No obstante, a esta diferencia se observó homogeneidad entre los promedios muéstrales de los cuatro grupos de animales.

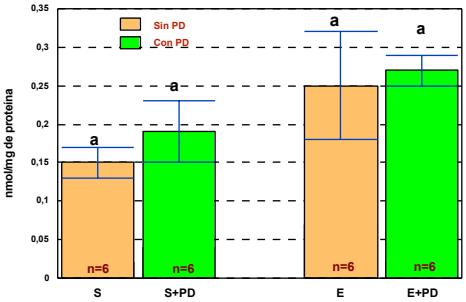


Figura 39. *Cantidad promedio de citocromos a+a3 en la membrana mitocondrial de músculo esquelético expresado en nmol/mg de proteína en los cuatro grupos de animales (p<0,05)*

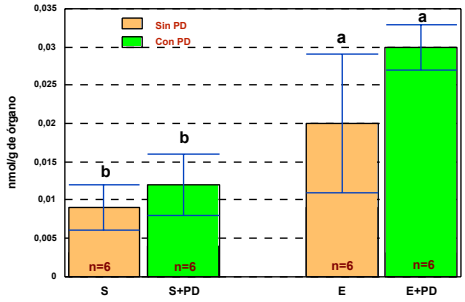


Figura 40. *Cantidad promedio de citocromos a+a3 en la membrana mitocondrial de músculo esquelético expresada en nmol/g de órgano en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

El valor mas alto encontrado se obtuvo en el grupo E+PD, con una cantidad de citocromos $a+a_3$ de 0,27 nmol/mg de proteína de músculo en comparación al valor mas bajo registrado en el grupo de ratas sedentarias (S) de 0,15 nmol/mg de proteína.

Al expresarse la cantidad de citocromos $a+a_3$ en gramos de órgano las diferencias se hicieron significativas, tal como se ilustra en la *Figura 40.*

En esta figura se observan diferencias estadísticas (p<0,05) entre ambos grupos de ratas sedentarias en comparación a los dos grupos de ratas extenuadas físicamente. Donde la diferencia más grande fue alcanzada entre el valor más alto obtenido de 0,03 nmol/g de órgano encontrado en el grupo E+PD, en comparación al más bajo obtenido en el grupo de ratas sedentarias sin PD.

La cantidad de citocromos $a+a_3$ en la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial en el corazón, se muestra en la *Figura 41*. Los resultados obtenidos en la cantidad de citocromos se observa variabilidad significativa (p<0,05) en las medias de los cuatro grupos de animales.

Se consignan diferencias estadísticas en la mayor cantidad de citocromos entre los animales extenuados con *Phlebodium decumanum* y los dos grupos de ratas sedentarias y extenuadas sin PD.

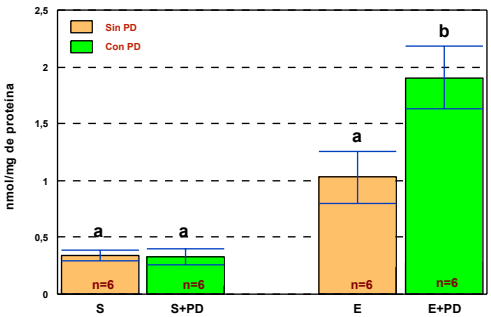


Figura 41. *Cantidad promedio de citocromos a+a3 en la membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

La mayor diferencia en la cantidad de citocromos $a+a_3$ se obtuvo en el grupo de E+PD, con una concentración de 1,9 nmol/mg de

proteínas en comparación a sus pares sin PD. Este último grupo con los otros dos de ratas sedentarias, observaron homogeneidad en sus medias muéstrales, registrándose la cantidad más baja de citocromos de 0,33 nmol/mg de proteínas de corazón en el grupo de ratas sedentarias con ingesta suplementaria de PD.

4.8.2. Citocromo b

Entre la ubiquinona y la citocromo oxidasa, hay varios transportadores intermedios uno de ellos es el citocromo b. Los resultados obtenidos en la cantidad de citocromo b de las mitocondrias del hígado en los cuatro grupos de animales, se ilustra en la *Figura 42.*

Se deja en evidencia en dicha ilustración una homogeneidad entre las medias muéstrales de los cuatro grupos de animales.

Nuevamente la mayor cantidad de éste citocromo de la membrana interna del hígado fue obtenida en ambos grupos de ratas extenuadas en comparación a las ratas sedentarias.

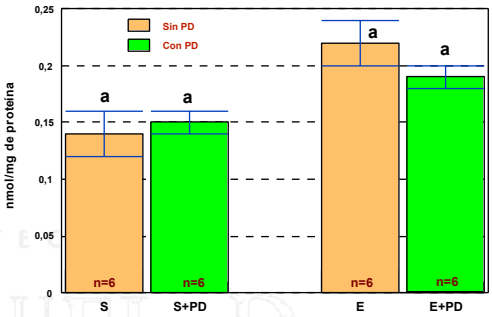


Figura 42. *Cantidad promedio de citocromos b en la membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p,0,05).*

La cantidad más alta encontrada de citocromo b se obtuvo en el grupo de animales extenuados sin suplemento alimenticio de PD, con una concentración de 0,22 nmol/mg de proteínas en comparación al grupo de ratas sedentarias sin ingesta de *Phlebodium decumanum,* con una cantidad de citocromo b de 0,14 nmol/mg de proteínas en la membrana mitocondrial de hígado.

La cantidad de citocromo b encontrado en la cadena de transporte de electrones en el tejido del músculo esquelético se ilustra en la *Figura 43*. En él se observa un aumento significativo (p<0,05) en la cantidad de éste citocromo en los grupos de animales ejercitados hasta la extenuación con suplemento alimenticio de PD, en comparación a las concentraciones que se encontraron en ambos grupos de ratas sedentarias y el grupo de extenuación sin PD.

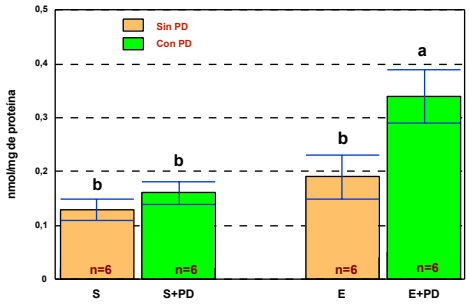


Figura 43. *Cantidad promedio de citocromos b en la membrana mitocondrial de músculo esquelético expresado en nmol/mg de proteína en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

La mayor diferencia encontrada en la cantidad de citocromo b se evidenció, entre el grupo de animales E+PD, con una concentración de 0,19 nmol/mg de proteína en comparación a 0,13 nmol/mg de proteína encontrado en el grupo de ratas sedentarias (S) No siendo significativa la variabilidad de dichas concentraciones en ambos grupos de ratas sedentarias con respecto al grupo de animales extenuados sin PD.

También, se obtuvieron resultados similares en las diferencias de la cantidad de citocromo b cuando estos fueron expresados en gramos de órgano fresco. Cuyos resultados se ilustran en la *Figura 44*.

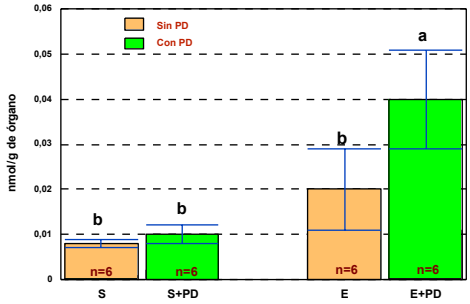


Figura 44. *Cantidad promedio de citocromos b en la membrana mitocondrial de músculo esquelético expresado en nmol/g de órgano en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

En esta gráfica se aprecia una cantidad más elevada de citocromo b en 0,04 nmol/g de órgano en el grupo de ratas extenuadas con suplemento alimenticio de *Phlebodiun decumanum,* en comparación a los dos grupos de ratas sedentarias. Cuyas concentraciones más bajas de 0,008 nmol/g de músculo fueron halladas en el grupo de ratas sedentarias sin ingesta de PD. Sin embargo, no se encontraron diferencias importantes entre el grupo de animales extenuados (E) y ambos grupos de ratas sedentarias.

Los resultados obtenidos en este citocromo de la cadena de transporte de electrones en el corazón se ilustran en la *Figura 45.* En ellos se muestra variabilidad significativa (p<0,05) en los promedios obtenidos en los diferentes grupos de animales.

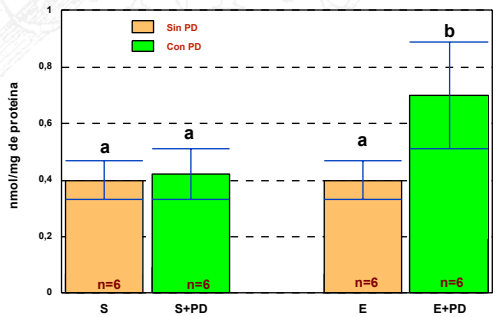


Figura 45. *Cantidad promedio de citocromos b en membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Sin embargo, la cantidad mas alta y significativa obtenida fue en el grupo E+PD, con una concentración de 0,7 nmol/mg de proteínas en comparación a los otros tres grupos, cuyos resultados fueron homogéneos.

El valor más bajo obtenido de 0,40 nmol/mg de proteínas correspondió al grupo de ratas extenuadas sin suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum.*

4.8.3. Citocromos c+c_1

Otros componentes estudiados de la cadena de transporte de electrones en el hígado fueron los citocromos c+c_1.Su importancia radica en que el citocromo c acepta electrones del complejo III para transportarlos posteriormente a la citocromo oxidasa o complejo IV en que el oxígeno molecular es el aceptor de electrones terminal.

Los resultados encontrados de estos citocromos en el hígado se ilustran en la *Figura 46*. En ellos se observó homogeneidad en los promedios muéstrales entre los cuatro grupos de animales.

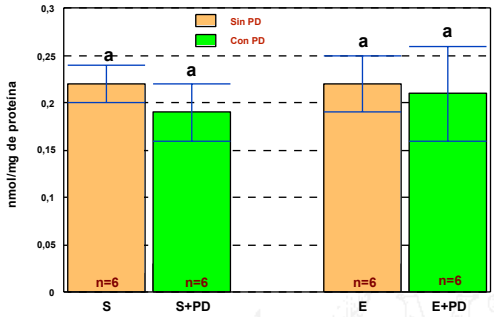


Figura 46. *Cantidad promedio de citocromos c+c1 en membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

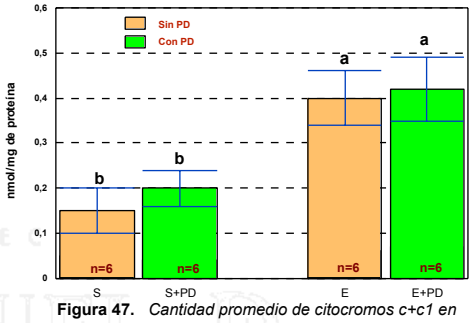


Figura 47. *Cantidad promedio de citocromos c+c1 en membrana mitocondrial de músculo esquelético expresado en nmol/mg de proteína en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

La fluctuación máxima y mínima de las concentraciones de citocromo c+c_1 osciló entre 0,22 nmol/mg de proteínas de membrana mitocondrial en el grupo de ratas extenuadas sin PD, y de 0,19 nmol/mg de proteínas en el grupo de animales sedentarias con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum*.

Los resultados encontrados en la cantidad de citocromos c+c_1 en la membrana mitocondrial del músculo esquelético se muestran en la *Figura 47*.

En este gráfico se observa una elevada y significativa ($p<0,05$) cantidad de citocromos c+c_1 en ambos grupos de ratas con ejercicio exhaustivo en comparación a los animales sedentarios.

La mayor cantidad de citocromos se obtuvo en el grupo de ratas extenuadas con PD, con una concentración de 0,42 nmol/mg de proteínas versus el valor más bajo encontrado de 0,15 nmol/mg de proteína de membrana de músculo en el grupo S.

Estos resultados fueron acentuados ante las mayores diferencias encontradas en las cantidades de citocromos $c+c_1$ de la membrana muscular, cuando estos resultados se expresaron por gramos de músculo como se ilustra en la *Figura 48.*

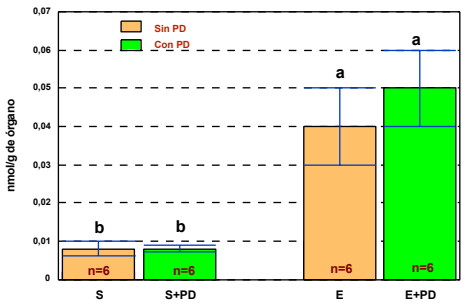


Figura 48. *Cantidad promedio de citocromos c+c1 en membrana mitocondrial de músculo esquelético expresado en nmol/g de órgano en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

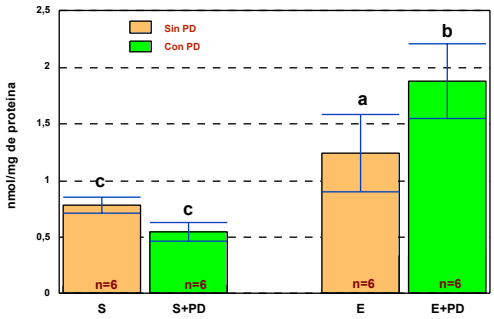


Figura 49. *Cantidad promedio de citocromos c+c1 en membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

No obstante, se encontró una homogeneidad en los promedios muéstrales de citocromos en los dos grupos de animales sedentarios y también en los dos grupos de ratas extenuadas. Sin embargo, las concentraciones de estos citocromos en los grupos de animales sedentarios fueron significativamente (p<00,5) mayores a las encontradas en los dos grupos de ratas ejercitadas hasta la extenuación.

La cantidad de citocromos $c+c_1$ obtenidos en el corazón se observa en la *Figura 49*, en él se ilustra una heterogeneidad en la cantidad de citocromos en los cuatro grupos de animales.

La cantidad más alta y significativa (p<0,05) de citrocromos a las 24 horas post-ejercicio se obtuvo en el grupo E+PD, con una concentración de 1,8 nmol/mg de proteínas en comparación a los otros tres grupos de animales.

Dejándose en evidencia una homogeneidad en las medias muéstrales de dicho citocromo entre los grupos de ratas sedentarias. El valor mas bajo obtenido de ésta concentración de 0,55 nmol/mg de proteínas de membrana mitocondrial de corazón se obtuvo en los animales sedentarios con ingesta suplementaria de PD.

4.9. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CITOCROMO OXIDASA

Ninguno de los citocromos además de ser transportadores univalente de electrones, es capaces de ceder electrones al oxígeno con la velocidad comparable a la citocromo oxidasa, lo que determina el papel cinético esencial de esta enzima

terminal para la respiración celular justamente con su capacidad de transferencia tetravalente de electrones al oxígeno para formar agua.

4.9.1. Hígado

En cuanto a los resultados obtenidos en la actividad específica de la citocromo oxidasa de la membrana mitocondrial del tejido hepático**,** sus resultados se ilustran en la *Figura 50.*

Se observa que dicha actividad fue similar en los cuatro grupos de ratas a las 24 horas post-ejercicio. Fue ligeramente mayor la actividad de esta enzima en ambos grupo de animales sedentarios en comparación a los grupos de ratas extenuadas.

No obstante, a esta homogeneidad la actividad más alta encontrada de esta enzima fue obtenida en el grupo de animales sedentarios sin PD, con una actividad de 3,8 µmol/mg.min seguida por una actividad de 3,5 µmol/mg.min hallada en el grupo de ejercicio más PD.

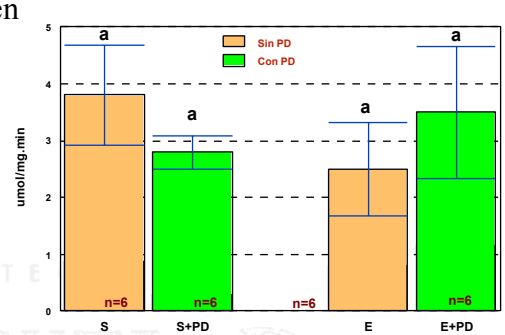


Figura 50. *Actividad enzimática promedio de la citocromo oxidasa en la membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

4.9.2. Músculo esquelético

Los resultados obtenidos en la actividad específica de esta enzima la citocromo oxidasa en el músculo esquelético se muestran en la *Figura 51.* Se evidencia en esta figura una actividad significativamente disminuida (p<0,05) de esta enzima en los dos grupos experimentales con ejercicio exhaustivo y en los animales sedentarios sin PD, al compararse con el grupo de ratas sedentarias con ingesta de *Phlebodium decumanum*.

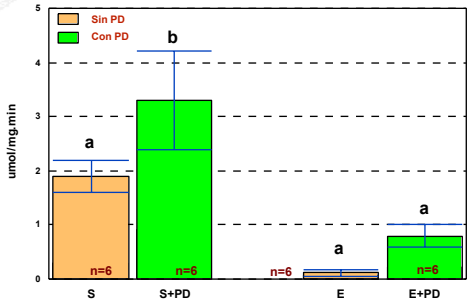


Figura 51. *Actividad enzimática promedio de la citocromo oxidasa en la membrana mitocondrial de músculo esquelético expresada en umol/mg.min en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

La actividad enzimática más elevada fue de 3,3 µmol/mg.min obtenida en las mitocondrias de los músculos del grupo de ratas sedentarias con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum* (S+PD), y la más baja encontrada de 0,11 µmol/mg.min de actividad en el grupo de ratas extenuadas sin PD.

4.9.3. Corazón

Por último, los resultados obtenidos en la actividad específica de la citocromo oxidasa de la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial del tejido miocárdico, se muestra en la *Figura 53,* en él se consigna una ligera tendencia a una menor actividad de esta enzima en los dos grupos de ratas extenuadas, en comparación a sus pares sedentarias.

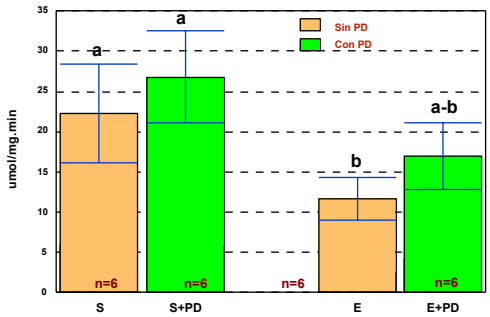


Figura 53 . *Actividad enzimática promedio de la citocromo oxidasa en membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Sin embargo, también se aprecia una significativa (p<0,05) e incrementada actividad de la citocromo oxidasa en los animales sedentarios con ingesta suplementaria de PD, en comparación a las ratas extenuadas sin éste suplemento.

El nivel de actividad más aumentado obtenido, fue de 26,8 µmol/mg.min en el grupo de ratas sedentarias con suplemento alimenticio de PD (S+PD), y la actividad más baja obtenida de 11,7 µmol/mg.min en el grupo de ratas con ejercicio extenuante sin suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum.*

4.10. TURNOVER DE LA CITODROMO OXIDASA

4.10.1. Hígado

El turnover es la cantidad de veces que se produce la reacción por unidad de tiempo expresada en segundos. Para la citocromo oxidasa se entiendió como la cantidad de moléculas de citocromo c reducido que oxidó la citocromo oxidasa en ésta unidad de tiempo. Haciendo referencia este parámetro a la actividad del enzima en sí.

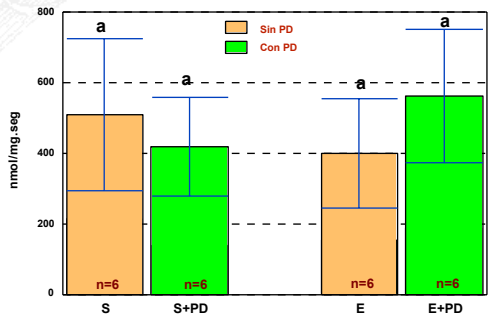


Figura 54. *Turnover de la citocromo oxidasa en la membrana mitocondrial de hígado en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

Los resultados encontrados en la actividad enzimática en el tejido hepático se ilustran en la *Figura 54.* Se ilustra en esta figura homogeneidad (p<0,05) entre los promedios muéstrales de ésta actividad enzimática en los cuatro grupos de animales.

Evidenciándose una mayor actividad en el grupo de animales extenuados con ingesta alimenticia de *Phlebodium decumanum*, seguido por el grupo de ratas sedentarias sin PD.

4.10.2. Músculo esquelético

En el caso del turnover de la citocromo oxidasa en el tejido del músculo esquelético sus resultados se presentan en la *Figura 55*, donde se observa una mayor variabilidad estadísticamente significativa (p<0,05) de su actividad en estos tejidos.

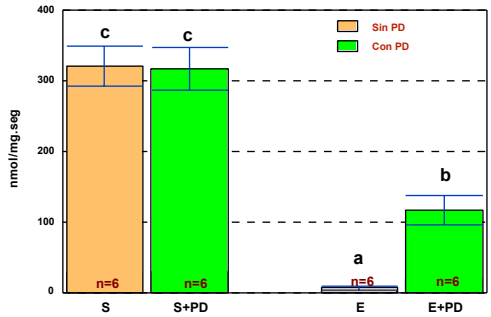


Figura 55. *Turnover de la citocromo oxidasa en la membrana mitocondrial de músculo esquelético en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

La actividad más incrementada fue encontrada en ambos grupos de animales sedentarios, y su diferencia fue estadísticamente significativa con respecto a los dos grupos de animales extenuados.

También se obtuvo diferencias estadísticas entre ambos grupos de ratas ejercitadas exhaustivamente hasta el agotamiento físico, consignando el grupo alimentado con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum* una actividad más incrementada en comparación a sus pares sin PD.

4.10.3. Corazón

Por último, el turnover de la citocromo oxidasa en los tejidos del miocardio también mostraron variabilidad entre las medias de los diferentes grupos como se ilustra en la *Figura 56.*

En ambos grupos de ratas sedentarias se observó diferencias estadísticamente significativas (p<0,05), ante la mayor actividad enzimática encontrada en estos animales al ser comparados con los dos grupos de ratas extenuadas físicamente.

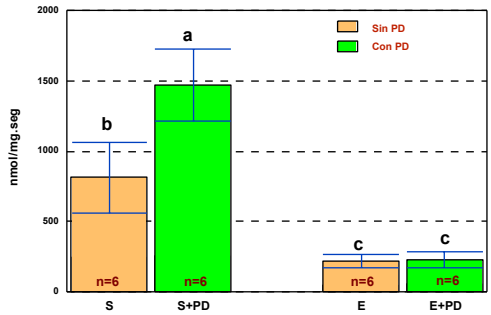


Figura 56. *Turnover de la citocromo oxidasa en la membrana mitocondrial de corazón en los cuatro grupos de animales (p<0,05).*

También se encontraron diferencias significativas entre los grupos de animales sedentarios, consignando los niveles más altos de actividad las ratas sedentarias con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum.* No obstante, se evidenció homogeneidad en la actividad promedio en ambos grupos de animales extenuados físicamente.

CAPITULO 5

DISCUSION DE RESULTADOS

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Hoy en día son ampliamente conocidos los efectos beneficiosos que se derivan de la práctica del ejercicio físico, en la prevención y como coadyuvante en el tratamiento de numerosas enfermedades crónicas relacionadas con el sedentarismo *(463)(464)*.

También existe considerable evidencia de que, durante su práctica, aumenta la producción de radicales libres *(RL)* que, cuando es excesiva, puede producir daño oxidativo en la mayoría de los tejidos, incluidos músculo esquelético, hígado, sangre, cerebro, músculo cardíaco y otras estructuras *(112)(113)*. Este daño es la consecuencia de un aumento del metabolismo aeróbico, y por tanto del consumo de oxígeno, durante el ejercicio intenso, que provoca un desequilibrio entre la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno *(ROS)* y las defensas antioxidantes, dando como resultado un daño peroxidativo *(472)(473)*.

La cadena de transporte de electrones mitocondrial, los polimorfonucleares y, la xantina oxidasa han sido identificada como las mayores fuentes de generación intracelular de radicales libres durante el ejercicio *(474)* Las ROS causan daño al sistema de defensa celular antioxidante, ya que determinan una disminución de las reservas de vitaminas antioxidantes y glutation, incrementándose la susceptibilidad al daño oxidativo *(475)*.

Sin embargo, los mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos han demostrado una gran adaptación al ejercicio severo y crónico *(476)*. Por tal motivo, este tópico ha despertado mucho interés en la última década, así como el de los efectos de las terapias con antioxidantes. El delicado balance entre prooxidantes y antioxidantes, sugiere que una dosis suplementaria de antioxidantes sería lo más deseable para actividades físicas intensas y, bajos ciertas condiciones fisiológicas darle un margen de protección a los deportistas *(145)*. No obstante, si su uso no es el adecuado en la justa medida para cada individuo, éstos pueden cumplir una función prooxidante *(477)*.

Se ha propuesto el uso de inmunomoduladores en el manejo del sobreesfuerzo físico, dada la disfunción del sistema inmune que acompaña a este síndrome, caracterizado por un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias. Por ello, la utilización de un suplemento con propiedades reguladoras de dicha disfunción, como es el caso del *Phlebodium decumanum (PD),* teóricamente estaría indicado como una buena alternativa en la suplementación alimenticia de los deportistas sometidos a grandes volúmenes e intensidades de trabajo físico.

Con este propósito el presente estudio se realizó sobre una muestra de ratas de laboratorio de raza *Wistar-Furth* de unos 6 meses de edad, sometidas a un programa físico extenuante con el fin de conocer el daño oxidativo y la disfunción del sistema inmune provocadas por el mismo, y su repercusión sobre diferentes tejidos: sangre, hígado, corazón y músculo esquelético.

Fueron elegidas en este experimento ratas como animales de experimentación en primer lugar por replicar y poder comparar estos resultados con la mayoría de los estudios encontrados en la bibliografía *(472)(479)(480)* sobre el tema y, en segundo lugar por, las características funcionales de estos animales para ser sometidos a esfuerzos sobre la cinta rodante. No obstante, a que las ratas de raza *Sprague-Dawley* parecieran ser la más resistente al ejercicio físico aquí, hemos elegido las *Wistar* por razones económicas, de accesibilidad y de frecuente utilización en todas las líneas de investigación de este laboratorio.

La selección de los animales fue un proceso complejo, ya que, a diferencias de lo reportado por otros estudios *(465)(466)* sólo un 30 % de ellos se adaptaron a correr sobre la cinta rodante y sólo un 24 % a correr a velocidades supramaximales. Quizá esta sea la razón por la que la mayoría de los trabajos revisados en el área de la investigación en ejercicio físico con animales de experimentación se hagan en inmersión.

No obstante, este tipo de protocolo experimental de natación presenta dos problemas. El primero es la dificultad para cuantificar con precisión la magnitud del gasto energético requerido y, en segundo lugar, la difícil reproducibilidad del esfuerzo realizado, dadas las diferentes conductas de movimiento de los animales en el medio acuoso. Dicha variabilidad en estas conductas hace que el esfuerzo realizado en el agua sea un ejercicio de carga variable, discontinuo y con gasto energético relativo diferente para cada animal. Aunque los criterios de extenuación más utilizados en estos modelos sean los de *Dawson y Horvath (474)* definidos como el momento en que las ratas quedan debajo la superficie del agua por 10 segundos, a juicio de los autores de este trabajo este criterio sigue siendo muy discutible.

El ejercicio elegido fue el más indicado, ya que la carrera sobre la cinta rodante permitió estandarizar, reproducir y controlar todas las variables intervinientes implícitas en un programa físico conducente a la extenuación, como la determinación exacta de la intensidad del esfuerzo y el gasto energético solicitado, ya que el estrés oxidativo inducido por el ejercicio depende de las variables implicadas en el modelo de agotamiento físico.

Las condiciones nutricionales también son un factor que puede alterar la actividad de la producción de radicales libres, las defensas antioxidantes y la funcionalidad del sistema inmune *(475*). La alimentación habitual requiere la ingesta de ciertos nutrientes que promueven la actividad antioxidante enzimática, y mantienen niveles suficientes de vitaminas y oligoelementos como protección frente al estrés oxidativo.

Sin embargo, en la mayoría de los trabajos de experimentación realizados, las conclusiones podrían ser objeto de controversia al no existir información sobre la alimentación aportada a los animales, dado que una inadecuada nutrición puede conducir a un incremento de *RL* o una deficiencia de los cofactores necesarios para la destrucción de las especies reactivas del oxígeno.

En el presente estudio esta variable fue controlada y homogenizada para los grupos de animales controles y experimentales con el objeto de no contaminar sus efectos sobre la variable independiente y de interés para el presente trabajo.

El experimento se inició con un período de 14 días de adaptación a la alimentación semi-sintética y, al *Phlebodium decumanum* (100mg/kg/día). La alimentación se componía de un 18% de proteínas, un 8% de grasas, un 67,5% de hidratos de carbono, un 1% de corrector vitamínico y un 3,5 % de corrector mineral. A cada rata se le proporcionó una cantidad de 20 gramos de comida y libre disposición de agua destilada por encontrarse en la alimentación los minerales requeridos. Esto permitió que los animales se hidrataran con agua libre de contaminantes durante todo el tiempo que duró el experimento.

La segunda semana se inició el periodo de adaptación de 7 días al ejercicio físico sobre la cinta rodante. Este período de adaptación física consistió en familiarizar a las ratas con el instrumento y a la adquisición de una conducta motora deseable, para lograr los siguientes objetivos: primero; que se desplazaran sobre la plataforma rodante y, segundo; que llegaran a correr a altas velocidades. No obstante, en trabajos similares no siempre ha sido informada esta etapa de adaptación *(467)(468),* que a juicio de los autores de este trabajo, es imprescindible por tratarse de animales que en un porcentaje muy bajo se adaptan al implemento y, con una mayor dificultad a los cambios de velocidad.

Por tal motivo, se inició el experimento con una carrera estable de una semana para que los animales fijaran la conducta motora aprendida en el período de adaptación, para luego continuar las otras tres semanas del entrenamiento, con un protocolo de incremento progresivo de la velocidad, que se inició a 35 m/min es decir a un 65-70 % del VO_2 max para estos animales *(128)(129)(130)*

lo que permitió asegurar que el esfuerzo llegara a ser máximo en los últimos períodos de trabajo. De hecho, en el periodo final se llegó a velocidades promedios de 48m/min que correspondieron a intensidades cercanas entre el 90-100% del VO_2 max.

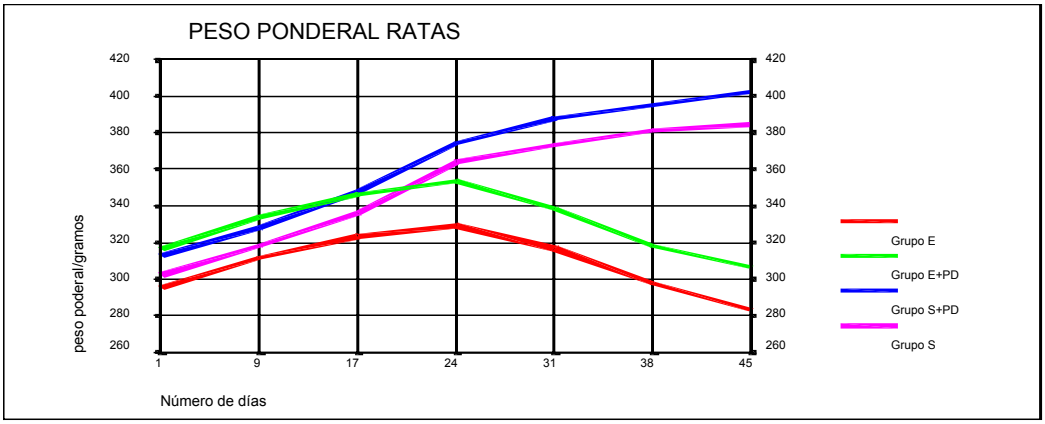
Las variables de tiempo y duración en este estudio fueron prescritas y dosificadas en atención a la revisión bibliográfica. En la mayoría de los estudios *(481)(482)(484)* el tiempo de entrenamiento físico con ratas osciló entre 4, 8 y 10 semanas dependiendo de las intensidades de los esfuerzos con un tiempo promedio de duración de alrededor de 60 minutos cuando se realizaban sobre el tapiz rodante, y superior a este tiempo cuando se trató de ejercicios de inmersión.

En este estudio, el programa de extenuación duró 4 semanas con sesiones de 60 minuto de carrera progresiva sobre la cinta rodante, evidenciándose en estos animales claros síntomas de fatiga que fueron corroborados por las observaciones obtenidas a lo largo de la experiencia. En primer lugar, observamos que al inicio del experimento al termino del período de adaptación al ejercicio, existían ligeras diferencias de los pesos pondérales de las ratas pertenecientes a los grupos con ejercicio (E y E+PD) en comparación a los grupos de animales sedentarios. Dicha diferencia alcanzó significación estadística ($p<0,05$) a partir del día treinta y uno del protocolo experimental, mostrando las ratas pertenecientes al grupo E menores pesos en comparación sólo con los dos grupos de ratas sedentarios (S+PD y S). Con relación al grupo E+PD, esta diferencia se hizo significativa a partir del día treinta y ocho, manteniéndose hasta el final del protocolo.

Estos resultados concuerdan con lo comunicado en diferentes estudios *(26)(27)(28)* realizados con seres humanos, donde se ha visto que a pesar de la variabilidad de los cambios de la composición corporal del ser humano con el ejercicio, la masa corporal total y el peso de la grasa por lo general tienden a disminuir con programas de entrenamientos de esta naturaleza.

En nuestro estudio, a pesar de que los animales no se encontraban en un programa diseñado para perder peso ni tampoco con manipulación dietética hipocalórica, los resultados mostraron una dramática y significativa reducción de la masa corporal total, debido a una disminución del peso graso, muscular y del residual.

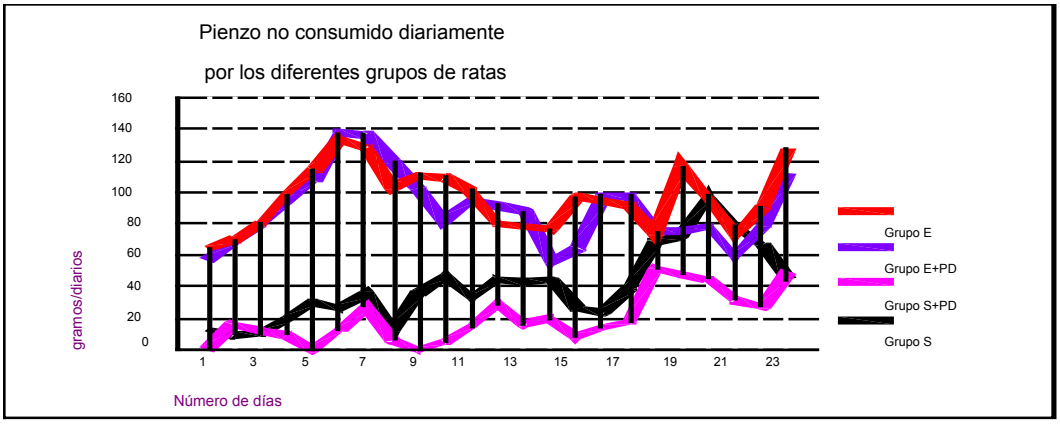
Aunque diversos estudios han demostrado que la prevención de la obesidad y el control del peso es un logro difícil sin la práctica de un ejercicio físico regular, *(29)* la actividad física excesiva o el sobreentrenamiento pueden determinar una pérdida de masa corporal total, afectando desfavorablemente el control del peso corporal *(28)*.



BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL D

Por otro lado sí, comparamos los pesos corporales promedios al inicio del experimento con los pesos al momento del sacrificio de dichos animales, los dos grupos tanto con suplemento de *Phlebodium decumanum* o no, mostraron una disminución ponderal significativa ($p<0,05$) por debajo del peso inicial. Quizá ésta pérdida pueda ser atribuible a la fatiga crónica inducida por el ejercicio extenuante, con alteraciones neuroendocrinas (hipercortisolemia y aumento de catecolaminas circulantes) que se manifiestan clínicamente como alteraciones de la alimentación, el crecimiento, el desarrollo, el metabolismo etc. *(75)(76)*. de estos animales.

En segundo término también quedaron en evidencia las alteraciones observadas en la ingesta alimenticia diaria, como se muestra en la siguiente figura, que ilustra la evolución diaria del pienso residual que no fue ingerido durante todo el tratamiento experimental. Así, se observa una marcada disminución del consumo de alimentos en los animales extenuados físicamente, una vez iniciado el entrenamiento, siendo éste otro parámetro que refleja las alteraciones fisiopatológicas inducido por el ejercicio físico extenuante y crónico en ambos grupos experimentales



Un tercero y último indicador aparente de estrés patológico inducido por sobreentrenamiento fueron los cambios conductuales aparentes y de agresividad observadas en estos animales.

A diferencias de muchos otros estudios en que se sacrificó a los animales inmediatamente después del esfuerzo y que cuyo objetivo era evaluar la respuesta oxidativa a un ejercicio agudo *(484)(485)(486)* Aquí el sacrificio de los animales fue a las 24 horas después del término del último ejercicio del programa de extenuación física, ya que, el objeto de estudio de este trabajo fue conocer la respuesta adaptativa del estrés oxidativo al ejercicio crónico de alta intensidad.

Se sabe que el aumento de la generación de Radicales Libres *(RL)* de oxigeno determinan una alteración de las membranas por el proceso de peroxidación lipídica que contribuye en un porcentaje significativo al daño celular *(493)* El efecto del ejercicio agudo en la peroxidación de los tejidos de los animales con entrenamiento ha sido raramente estudiado *(494)*.

En este trabajo hemos cuantificado los daños de la peroxidación lipídica a las 24 horas post ejercicio en el plasma, en el citoplasma y, en las membranas mitocondriales de corazones, hígados y músculos de los dos grupos de ratas que realizaban ejercicio físico extenuante y crónico.

Se compararon las concentraciones de hidroperóxidos, de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, de las defensas antioxidantes y la funcionalidad mitocondrial a un nivel de significacia de un alfa 0,05 entre los grupos de ratas extenuadas físicamente con sus similares sedentarias

5.1. PESOS DE ÓRGANOS.

5.1.1. Hígado

Uno de los órganos estudiado fue el hígado, por la importancia que puede tener el daño oxidativo en los hepatocitos por isquemia-reperfusión al producirse H_2O_2 inducido por el ejerció físico extremo. Su importancia es vital por la responsabilidad que tiene en los procesos de detoxicación del organismo, al eliminar los xenobióticos que penetran en él y neutralizar las sustancias potencialmente letales, además de almacenarse en este órgano las vitaminas antioxidantes A y E *(159)*

Este órgano redujo significativamente su peso en los dos grupos de animales extenuados físicamente ($p<0,05$), comparados con los animales sedentarios y, fue similar en ambos grupos con ejercicio exhaustivo. Los pesos de ambos grupos de ratas sedentarias fueron significativamente más grandes en un intervalo de un 95% de confianza en comparación a las ratas extenuadas. La mayor diferencia observada en el peso de este órgano se encontró en los animales sedentarios sin PD, con un 27 % más de peso comparados con los más bajos obtenidos en el grupo de ratas extenuadas sin PD.

La disminución del tejido hepático, quizás pudiera explicarse debido a la reducción de los constituyentes hísticos que forman parte de materiales orgánicos hidratados complejos como son, las proteínas y el glucógeno *(106)*. En consecuencia, cuando se pierde glucógeno o proteínas, también se pierde agua que refleja la tasa de hidratación *(105),* que se encontró muy disminuida al momento del sacrificio de los animales, observándose una incrementada hemoconcentración ante la disminuida cantidad de sangre en las ratas que hacían ejercicio. Estos resultados, en definitiva, puede haber repercutido en el peso de éste y de los demás órganos.

También hemos encontrado una disminución, que en algunos casos fue significativa ($p<0,05$) en las concentraciones de proteínas del tejido hepático en los animales sometidos al programa de ejercicio exhaustivo en comparación a sus pares sedentarios. La mayor concentración de proteínas en la membrana

mitocondrial, la obtuvimos en el grupo de ratas sedentarias con *Phlebodium decumanum* en comparación a los animales extenuados con PD.

Las concentraciones de proteínas citoplasmáticas también mostraron aquí una disminución significativa ($p<0,05$) en estos mismos grupos de ratas sedentarias y extenuadas con PD. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en sus concentraciones entre ambos grupos de animales extenuados.

Según *Quiles JL (230)* en un trabajo con ratas sometidas a un ejercicio máximo hasta el agotamiento también observó un descenso significativo en el peso del hígado en ambos grupos experimentales al compararlos con sus respectivos controles sedentarios. Argumentando este autor, que estas diferencias podrían deberse a la conocida activación de la glucogenólisis hepática consecuencia del ejercicio físico.

5.1.2. Músculos esqueléticos

Con relación a los pesos en los músculos esqueléticos de los grupos de ratas extenuadas se muestra que los resultados observan un menor peso estadísticamente significativo ($p<0,05$) entre el grupo que hacían ejercicios sin PD (E) y aquellos grupos de animales sedentarios. Probablemente, durante el ejercicio intenso crónico y prolongado, los animales experimentales de este grupo, utilizaron las proteínas como substrato significativo de energía *(51)* siendo quizás, este uso mayor cuando menor fue la presencia de glucógeno *(59)*.

De hecho las concentraciones de proteínas expresadas en mg/ml hallados en la membrana mitocondrial del músculo esquelético fueron menores en los grupos de animales extenuados en comparación a los sedentarios.

Se observó una diferencia significativa ($p<0,05$) entre las menores concentraciones de proteínas obtenidas en el grupo de ratas extenuadas con PD y los animales sedentarios con *Phlebodium decumanum.*

Si bien es cierto, no se evidenciaron diferencias estadísticas en las concentraciones de proteínas de membrana mitocondrial entre el grupo de ratas extenuadas sin PD y el grupo de ratas sedentarias con PD, la diferencia fue de un 31,5 % menos de proteínas en el grupo de ratas llevadas hasta la extenuación física sin PD.

Por lo tanto la disminución de los pesos musculares de los grupos de ratas entrenadas hasta el sobreentrenamiento puede quizá atribuirse al catabolismo de las proteínas durante el ejercicio y al hecho de que la mayor degradación proteica ocurre cuando las reservas de glucógeno están bajas, lo que se ha reflejado en un estado de inanición de corto plazo en estos animales.

Además también hemos encontrado una disminución de las concentraciones de proteínas citoplasmáticas en el tejido muscular, observándose una concentración significativamente menor ($p<0,05$) en los grupos de animales extenuados en comparación a los sedentarios.

Las diferencias más llamativas se encontraron al comparar los niveles más elevados de proteínas en el grupo sedentario suplementado con *Phlebodium decumanum* en comparación al grupo de ratas extenuadas sin PD. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre los dos grupos de animales extenuados físicamente. Las concentraciones más bajas de proteínas citoplasmática se encontraron en el grupo de ratas extenuadas sin *Phlebodium decunanum* (12.7%), a pesar de que una de las adaptaciones al ejercicio es la proliferación del tejido conjuntivo y de las células satélites que rodean la fibra muscular individual *(51)(53)*. Esto determina un espesamiento y fortalecimiento del entramado del tejido conjuntivo del músculo. Sin embargo, esta adaptación muscular solamente fue evidenciada en los resultados obtenidos en los pesos de los músculos esqueléticos *vastus lateralis* de los animales entrenados hasta el agotamiento con ingesta de PD. En estos animales no se evidenció pérdida significativa ($p<0,05$) del espesamiento muscular al compararse con los pesos de los músculos esqueléticos de los grupos de ratas sedentarias, ni tampoco se encontró un aumento significativo por efecto de un entrenamiento físico.

Estos resultados difieren de los de otro estudio que mostraba aumentos del 30% en el diámetro medio del músculo soleo de ratas ejercitadas en comparación con otras no ejercitadas, con un aumento en el primer caso del 46% en el número de núcleos presentes dentro de la célula *(79),* como muestra de un incremento marcado en la síntesis de ADN y de la proliferación de pequeñas células satélites mononucleares localizadas debajo de la membrana de base adyacente a las fibras musculares *(70)*.

5.1.3. Corazón

En el caso del corazón no se observaron diferencias estadísticas ($p<0,05$) en los pesos de éste órgano entre los grupos de ratas sedentarias y los otros dos grupos de comparación. Los grupos de animales con ejercicio crónico extenuante evidenciaron sólo una ligera disminución no significativa de los pesos del corazón lo que no coincide con la adaptación biológica fundamental de hipertrofia del músculo cardiaco a una mayor carga de trabajo *(465)* atribuida en parte a una mayor síntesis de la proteína celular con una reducción concomitante su degradación *(56)*.

No obstante, a pesar de la falta de diferencias significativas encontradas entre los pesos de los corazones de los grupos de animales extenuados versus sedentarios se logró alterar la síntesis y degradación proteica y quizá por ende al sabido aumento o disminución del contenido celular de ARN *(70)*.

En este estudio hemos evidenciado menores concentraciones de proteínas, en algunos casos significativos ($p<0,05$) tanto en la membrana mitocondrial como en el citoplasma del tejido miocárdico, en los animales extenuados en comparación a los sedentarios. La mayor diferencia en la concentración de proteínas en la membrana mitocondrial la obtuvimos entre el grupo de ratas sedentarias con *Phlebodium decumanum* y el de los animales extenuados con PD.

Las concentraciones de proteínas citoplasmáticas también aquí mostraron una disminución significativa en los grupos de ratas extenuadas en comparación a las sedentarias sin PD. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos de animales extenuados.

Quizás esta ligera tendencia a disminuir el peso del corazón, posiblemente relacionado con el aumento del catabolismo en los animales extenuados, podría haberse hecho más evidente si el tiempo de exposición al sobreentrenamiento hubiera sido mayor, ya que, contrariamente al efecto inducido al parecer por éste, el ejercicio regular conlleva a que las míofibrillas individuales se hipertrofien y, al mismo tiempo, aumentan el número de filamentos contráctiles dentro de la fibra muscular *(51)* y con ello el aumento del peso muscular.

En este estudio, en el grupo de ratas extenuadas con suplementación de PD se observó una menor tendencia a disminuir el peso promedio del corazón inducido por el ejercicio físico extenuante. Este hecho parece ser debido a que el PD podría tener una acción importante similar a la encontrada en el músculo

esquelético, tanto por la estimulación de la síntesis como por el retraso del inicio de la progresiva degradación proteica en este órgano. Estos resultados merecen la realización de nuevos trabajos futuros para profundizar en las acciones del PD sobre el efecto del estrés mecánico junto al estrés diastólico por sobrecarga hemodinámica, que han mostrado in vivo ser potentes inductores de apoptosis en el cardiomiocito *(112)*. Por lo tanto, es posible que en condiciones de presión arterial elevada y sobrecarga mecánica del corazón, las respuestas a un esfuerzo crónico y extenuante indujeran la apoptosis de los cardiomiocitos en estos animales. El efecto protector del *Phlebodium decumanum* en el miocardio ante el daño inducido por el ejercicio físico intenso y crónico, queda evidenciado a través de la diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) entre los grupos E y el E+PD, tal como se ha mencionado anteriormente, y además en la homogeneidad estadística observada entre las medias muéstrales al comparar los grupos de ratas sedentarias con y sin ingesta suplementaria de PD.

5.2 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

5.2.1 ROOH de hígado

En el tejido hepático se observó en este estudio un mayor daño celular en comparación a los otros órganos, músculo esquelético y corazón, que fue estadísticamente significativo ($p<0,05$) al comparar las concentraciones de hidroperóxidos (ROOH), con un intervalo de confianza del 95%. El incremento en las concentraciones de ROOH fue un 66,8% mayor en los animales extenuados sin PD (E) comparados con las concentraciones básales más bajas obtenidas en el grupo de ratas sedentarias más PD (S+PD).

Estos resultados coinciden con los hallazgos encontrados por *Venditti y col (1997)(494)* en dos grupos de ratas, unas sedentarias sacrificadas en reposo e inmediatamente después de haber nadado exhaustivamente y otro grupo previamente entrenado en un programa de natación de 10 semanas y sacrificadas 48 horas después del ultimo ejercicio. Los resultados mostraron un incremento significativo del contenido de malondialdehido y de hidroperóxidos en los tejidos de las ratas con y sin entrenamiento después de un ejercicio intenso**.** El incremento de estas concentraciones (ROOH) después del ejercicio extenuante fue significativamente mayor en el hígado y corazón que en el músculo esquelético, en ambos grupos, argumentando los autores que el incremento promedio de la lipoperoxidación en las ratas entrenadas fue menor en los músculos e hígado que en corazón, ya que al parecer, bajo ciertas condiciones

fisiológicas los microsomas de los hepatocitos generan radicales libres de oxígeno, principalmente por vía del sistema citocromo P_{450} *(495)(496).*

Estos hallazgos son coincidentes a los encontrados en nuestro estudio donde, el tejido hepático mostró una mayor concentración de hidroperóxidos comparado con el músculo esquelético (incremento del 84,5 %) y con el miocardio (88,4 % de incremento).

Se ha dicho que la tasa de producción de H_2O_2 se aumenta en los microsomas por un elevado consumo de oxigeno. *Kim et al (498)* han reportado que la formación de ROS aumentó en los microsomas de hígado de ratas viejas y, menor fue su aumento en los animales crónicamente activos. que sus contrapartes sedentarias. No obstante, *Alessio et al (499)* informaron una falta de aumento de la lipoperóxidacion en el hígado de las ratas jóvenes con entrenamiento físico.

En nuestro estudio se encontró un incremento significativo ($p<0,05$) entre las diferencias de los promedios muéstrales de ROOH expresados en nmoles/mg de proteína de membrana mitocondrial de hígado en el grupo de ratas activas (E) comparadas con el grupo de ratas extenuadas con ingesta suplementaria de PD (E+PD). La menor lipoperoxidación observada en éste último grupo (E+PD), podría responder a un efecto protector del *Phlebodium decumanum* ante el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico, no evidenciándose diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de ROOH en las membranas mitocondriales del hígado en los dos grupos de animales sedentarios

5.2.2. ROOH de músculo esquelético

Para valorar el daño orgánico provocado por el ejercicio físico extenuante, estudiamos además el tejido muscular esquelético (*vastus lateralis)* debido a las evidencias científicas que postulan la participación de radicales libres en la fatiga muscular debida al ejercicio extenuante, y en los fenómenos de isquemia reperfusión *(487)(488).*

En los músculos esqueléticos del grupo de animales con ejercicio de alta intensidad sin suplementación alimenticia de PD (E) se observó un incremento significativo ($p<0,05$) de los hidroperóxidos (ROOH) en comparación a los dos grupos de ratas sedentarias. Este incremento fue de 35.9 % en comparación al valor más bajo obtenido en los grupos de animales sedentarios con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum*. Estos resultados concuerdan con los de

otros estudios *(84)(85)(100)(105)* que afirman que, el ejercicio físico intenso genera un estrés oxidativo, posiblemente por un escape de electrones a nivel de ubiquinona-citocromo b, en la cadena mitocondrial de transporte de electrones con producción de anión superóxido (O_2-.) *(84)(85),* o por la isquemia-reperfusión o la autooxidación de catecolaminas plasmáticas durante el esfuerzo *(495).*

Ya en 1982, *Davies et al (496)* reportaron que las imágenes de resonancia paramagnético (EPT) estaban intensificadas en los músculos homogenizados de ratas, después de un entrenamiento intensivo de carreras. *Bemjma y Ji (484)* usando (DCFH) como instrumento de prueba intracelular demostraron recientemente que la producción de ROS fue significativamente incrementada en los músculos laterales de ratas jóvenes y viejas después de un ejercicio físico extremo.

Existe evidencia de que la producción de O_2- en la mitocondria está incrementada durante el ejercicio. *(484)* La premisa de que el ejercicio incrementa la producción mitocondrial de ROS se basa en la bien conocida evidencia que el consumo total de oxigeno se incrementa dramáticamente durante el ejercicio extremo. Se calcula que el aumento es de 20 veces mientras que el VO_2 a nivel de fibra muscular se estima que puede elevarse hasta 100 veces *(472).*

Los resultados sobre músculo esquelético del grupo de ratas extenuadas sin PD (E) han mostrado la concentración más alta de hidroperóxidos, salvo en el caso del hígado (que fue un 15.5% superior), en comparación a los otros órganos. No obstante, entre el grupo de ratas extenuadas con suplemento alimenticio de PD (E+PD) no se evidenció diferencias significativas entre los promedios muéstrales de ROOH con el grupo de ratas entrenadas sin PD (E),

Sin embargo, los animales extenuados y suplementados con PD evidenciaron una menor concentración de hidroperóxidos en un 24,8 % en comparación las ratas extenuadas sin PD. El efecto protector de este inmunorregulador se observó además al no encontrarse diferencias estadísticas de estas concentraciones entre el grupo E+PD con los otros dos grupos de ratas sedentarias con y sin ingesta de PD.

El menor daño oxidativo observado en las membranas mitocondriales del músculo esquelético de estos animales nos lleva a plantearnos un posible efecto

protector del PD a través de una acción reductora de la producción de ROS o por la mejora del sistema de defensa antioxidante.

5.2.3. ROOH de corazón

El corazón tiene una mayor concentración de mitocondrias, que le permite desarrollar una capacidad oxidativa tres veces mayor que el músculo esquelético durante el ejercicio vigoroso *(489)*.

El miocardio es esencialmente un tejido aeróbico. Alrededor del 80% del oxígeno que fluye por las arterias coronarias es extraído por el miocardio *(490)* Ya que, durante el ejercicio se satisface el aumento de la demanda de oxígeno miocárdica a través de un aumento proporcional del riego sanguíneo coronario, que lleva asociado un incremento en la formación de radical superóxido. Este podría modificar la organización estructural y funcional de los organelos por la acción de ROS y la acumulación de calcio, limitando la fosforilación oxidativa *(489)* y la contractibilidad de dicho órgano para cumplir con su función.

En el caso del corazón los resultados encontrados en las concentraciones de ROOH no son ninguna excepción, ya que al igual a los tejidos musculares y hepáticos los hidroperóxidos se encuentran aumentados en los dos grupos de animales que realizaban actividad física en comparación a los grupos de animales sedentarios. Este aumento fue de un 72,3% cuando fueron expresados en nmol/mg de proteínas en el grupo E en comparación a los valores básales más bajos encontrados en los animales sedentarios del grupo S+PD.

Una suficiente cantidad de datos indican que el ejercicio de alta intensidad puede causar daños al incrementarse la producción de RL en el músculo esquelético y en el miocardio. *Kumer et al (500)* demostraron un incremento de los radicales libres en los corazones homogenizados de las ratas, después de sesiones consecutivas en días sucesivos de ejercicio físico. *Bemjma y Ji (483)* recientemente también demostraron que la producción de ROS fue incrementada en el corazón en ratas adultas por el ejercicio físico. Sin embargo, también se ha demostrado que ejercicios extremos realizados en vivo e *in-vitro* pueden aumentar la producción de ROS en el esqueleto muscular, pero con un menor grado de certeza en el corazón *(484)*.

Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados ya que en este órgano hemos observado las concentraciones más bajas de hidroperóxidos, con un 88,4 % menos comparado con la tasa más alta obtenida en la membrana mitocondrial del hígado y, una diferencia de un 25,3 % menos en relación ala tasa más alta obtenida en el músculo esquelético.

Los grupos de animales con ingesta de PD obtuvieron las concentraciones más bajas de hidroperóxidos en el corazón. No obstante, en los grupos de animales extenuados no se evidenciaron diferencias estadísticas entre ellos a un alfa de 0,05 pero, se ha obtenido una diferencia de un 10,2 % menos de ROOH en el grupo E+PD comparado son el grupo de ratas extenuadas sin PD.

También se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$) en la menor concentración de ROOH en los grupos de animales sedentarios con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum* en comparación con las ratas sedentarias (S)

Quizá, la diversidad de resultados encontrados en la literatura pueda deberse primero a las limitaciones metodológicas y, en segundo lugar, a que la producción de ROS durante el ejercicio puede proceder de muchas fuentes celulares potenciales *(474)*. Algunas fuentes pueden ser más importantes que otras en ciertos órganos, dependiendo de la actividad metabólica y de la actividad física realizada. Al parecer, estas fuentes no son excluyentes y, pueden ser activadas simultáneamente. Según *Alessio et al (499)* el entrenamiento resulta en una adaptación ante una disminuida reacción peroxidativa en los tejidos. Sin embargo, *Venditti (494)* muestra que este mecanismo de adaptación tiene lugar en el músculo e hígado pero no en el corazón de ratas adultas.

5.2.4. TBAR de hígado

Aunque existen dudas en la fiabilidad de algunos de los marcadores de peroxidación lipídica *(105)(104)*, en nuestro estudio la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) tuvo una estrecha correlación positiva con las concentraciones de ROOH en todos los órganos estudiados. Estos resultados dejan de manifiesto, a partir de este biomarcador lipídico, un importante y significativo daño peroxidativo con un nivel de confianza de un 95% en el hígado de los animales expuestos al ejercicio físico extenuante.

El tejido hepático de los animales ejercitados exhaustivamente sin PD mostró un valor significativamente superior ($p<0,05$) (un 80,5%) en las concentraciones de TBARS en comparación con las concentraciones básales del grupo de ratas sedentarias con *Phlebodium decumanum,* cuyas concentraciones fueron las más bajas. De igual forma, el grupo de animales extenuados con PD mostró una reducción de sus concentraciones de TBARS (25,7 %) en comparación con sus pares sin ingesta de *Phlebodium decumanum,* quedando demostrado con significación estadística que los grupos de ratas extenuadas observan las concentraciones más incrementadas de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico. Estas respuestas pueden atribuirse a los mecanismos implícitos en el incremento del metabolismo aeróbico, con el consecuente aumento de O_2-, y

al fenómeno de isquemia-reperfusión que se produce durante el ejercicio, ya que la distribución de la sangre oxigenada se hace cada vez más restringida a numerosos órganos y tejidos para satisfacer la demanda de oxígeno necesario a los músculos activos *(109)*.

En comparación con los otros dos órganos, en el tejido hepático se obtuvo la menor concentración de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico. La concentración más alta se encontró en el corazón.

La mayor peroxidación lipídica en el hígado se consignó en el grupo de ratas extenuadas sin PD con un valor de 8,2 nmol/mg de membrana mitocondrial. Este valor supone un 55,0 % menos de TBAR en comparación a la tasa más alta evidenciada en el tejido miocárdico. La diferencia de este daño oxidativo del tejido hepático con respecto al músculo esquelético fue menor en un 36 % del valor máximo encontrado en los grupos de animales extenuados.

En nuestros resultados sobre ambos biomarcadores de peroxidación lipídica, se aprecia que el efecto protector antioxidante del PD sobre el hígado parece ser efectivo para prevenir el daño hepático, ya que, las sustancias reactivas de ROOH fueron estadísticamente inferiores ($p<0,05$) y las de TBAR en un 25,7 % menos, cuando los animales fueron alimentados con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum*.

Experiencias similares dosando TBARS fueron encontradas cuando aumentaron y se duplicaron dichas concentraciones en el músculo y en el hígado en ratas entrenadas, que en este caso consumían vitamina E y en otras que estaban deprivadas de esta vitamina, dejando en evidencia en estas últimas que el aumento fue menor debido a que los niveles de vitamina E ya eran altos durante el reposo *(467)*.

Este aumento de las especies reactivas del oxígeno puede ser atribuible entre otras cosas a que las regiones deprivadas temporalmente de un adecuado riego sanguíneo entran en un estado de hipoxia, que es proporcional a la intensidad del esfuerzo, y aún más si es superior al consumo máximo de oxígeno *(111)*. Incluso se argumenta que el propio músculo entra en un estado de hipoxia por insuficiente aporte de oxígeno *(110),* reoxigenándose estos tejidos una vez terminado el ejercicio, con la esperada producción de radicales libres que la acompaña. *(111)*.

5.2.5. TBAR de músculo esquelético

En el músculo esquelético, el incremento de las concentraciones de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR) en este tejido fue también

estadísticamente significativo (p<0,05) al comparar los dos grupos de ratas extenuadas con los grupos de animales sedentarios con o sin suplemento alimenticio de PD.

También *Alessio et al (499)* encontraron un aumento de la peroxidación lipídica en los músculos de fibras blancas, pero no en los rojos de ratas jóvenes con entrenamiento de 20 minutos de carrera. Estos hallazgos han sido demostrados bajo distintas condiciones experimentales.

Varios investigadores han demostrado un aumento de la producción de ROS. durante la contracción muscular *in vitro. Jackson et al (501)* con estimulaciones eléctricas musculares, encontraron un 70% de incremento de la imagen obtenida mediante resonancia paramagnética (EPR) de los músculos en movimiento versus los músculos en reposo. *Reid et al (502)*, usando el método DCFH en músculos diafragmáticos aislados, demostraron que el ROS no solamente fue incrementado durante la contracción de éstos, sino que además puede contribuir a una pequeña fatiga *in situ. O`Neill et al (503)* evidenciaron un incremento de OH. en los músculos tríceps contraídos de felinos, proporcional la máxima tensión desarrollada.

Sin embargo, en nuestro estudio en el músculo esquelético se observó una concentración de TBAR intermedia entre los valores obtenidos en hígado y corazón.

El mayor daño oxidativo en el músculo esquelético fue encontrado en los grupos de animales extenuados sin PD, con una concentración de ROS de 12,8 nmol/mg de proteína mitocondrial, que correspondía a una peroxidación lipídica un 29,7 % menor que la obtenida en el tejido miocárdico.

Estos hallazgos de daño celular concuerdan con las hipótesis de que la mitocondria es el principal fuente de generación de ROS durante el ejercicio, lo que se sostiene por las evidencias de estudios que muestran el daño oxidativo mitocondrial. En el índice de control respiratorio del complejo cuatro se ha demostrado que este daño se incrementa en mitocondrias de músculos, hígados y corazones después de un ejercicio extenuante, indicando una posible filtración en la membrana celular *(504)*.

Los resultados que hemos encontrados en el músculo esquelético son similares con los encontrados en el hígado, donde se observó un menor daño en el grupo activo con ingesta de *Phlebodium decumanum* en comparación con el grupo de ratas activas sin PD, alcanzando estas diferencias significación estadística (p<0,05).

Los resultados del grupo con ejercicio y sin PD evidenciaron un incremento de un 76,6% en TBAR en comparación con el menor valor observado en los grupos de animales sedentarios con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum,* mostrándose nuevamente con este estudio que el ejercicio extenuante incrementa las concentraciones de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico en la membrana mitocondrial de músculo, como lo evidencia el aumento significativo ($p<0,05$) de las concentraciones de los animales con ejercicio en comparación a las mas bajas obtenidas en ambos grupos de ratas sedentarias.

Los resultados encontrados en nuestro estudio coinciden con los comunicados por *Venditti y col (494)* que encontraron un aumento de la lipoperoxidación en los hígados y músculos de ratas adultas. También en otro estudio donde se midieron los hidrocarbonos expirados como producto final de la peroxidación lipídica, se encontró un aumento después de un ejercicio intenso, expresado en un 60-100 % en los niveles de malondialdehido, detectado en el stratum y corteza de animales sometidos a un esfuerzo de un 100 % del consumo máximo de oxígeno *(466)*. Sin embargo, no todos los autores han encontrado los mismos resultados después del ejercicio *(469)(470)*. La ausencia o la coincidencia de los resultados puede ser atribuida a las diferencias de metodología y protocolos utilizados.

La importancia de esta protección es aún más patente dadas las características del esfuerzo al cual fueron sometidos estos animales, ya que se sabe que los niveles de catecolaminas plasmáticas se elevan durante ejercicios prolongados *(483)*, aunque las catecolaminas también mejoran el metabolismo oxidativo del músculo esquelético y miocárdico por la vía de la activación de los receptores beta-adrenérgicos, lo que también podría suponer un incremento potencial de la producción de ROS en la mitocondria *(511)*. El catabolismo y la autooxidación de catecolamina se asocia con la formación de O_2-, lo que se considera como una posible fuente de producción de especies reactivas del oxigeno y responsable del daño por isquemia y reperfusión en el corazón *(483)*.

Quizá, el *Phlebodium decumanum* sea un excelente reductor del estrés oxidativo ante el daño inducido por la autooxidación de catecolaminas en ejercicio físico intenso y de larga duración. Sin embargo, la importancia de una cantidad significativa de catecolaminas como fuente de producción de ROS durante el ejercicio no se ha investigado en profundidad.

5.2.6. TBAR de corazón

En el corazón se obtuvo el mayor daño oxidativo por ROS, como le muestra la mayor concentración de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico en

comparación a las consignadas en los tejidos hepáticos y en el músculo esquelético. La acumulación de TBAR fue mayor en corazón que en los otros órganos, probablemente porque el sistema enzimático que lo elimina tan eficientemente en el hígado y músculo esquelético no lo hace de igual forma en mitocondrias de tejido cardiaco, lo que podría determinar pérdida de funcionalidad.

Se encontraron incrementadas concentraciones de TBAR en ambos grupos de ratas extenuadas, existiendo diferencias significativas entre los dos grupos ($p<0,05$). Así, encontramos una diferencia de un 35,8 % menos de TBAR en el grupo E+PD en comparación a la mayor concentración obtenida en el grupo E de ratas ejercitadas hasta el agotamiento. Estos resultados concordarían con el efecto protector del *Phlebodium decumanum* ante la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio, en este órgano, observándose además concentraciones significativamente menores ($p<0,05$) en los grupos de ratas sedentarias en comparación a las extenuadas, pero no entre estos dos grupos.

Estos resultados indican que los animales expuestos a las mayores concentraciones de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico observan un mayor daño oxidativo en las membranas mitocondriales del miocardio por efecto del ejercicio intenso. Se apreció una incrementada peroxidación de un 62,7% en este órgano cuando se compararon los resultados correspondientes al grupo E con el de ratas sedentarias con PD a un nivel de significación de las medias de un alfa 0,05.

La xantina oxidasa (XO) ha sido reconocida como la mayor fuente de generación de radicales libres en la isquemia-reperfusión del corazón *(505)(506)* Durante la isquemia el ATP es degradado a ADP y AMP por la energía demandada por la contracción del miocardio. Si el oxígeno es insuficiente, el AMP es continuamente degradado a hipoxantina, a xantina y, en último término, de xantina a ácido úrico. La reducción univalente del oxigeno en la reacción catalizada por la XO produce la formación del radical anión superóxido (O_2.-) *(506)*

Para activarse esta vía debe haber presente en el tejido suficiente cantidades de hipoxantinas y de xantina. La XO se debe convertir de su forma reducida a la forma oxidada por la proteasa intracelular que puede ser activada por Ca^{2+}. También el oxigeno debe estar presente como aceptor de electrón, argumentándose que el ejercicio de alta intensidad puede producir un ambiente celular favorable para activar esta vía de la XO *(507)*. Se ha observado una acumulación de la hipoxantina después de una contracción muscular intensa y un aumento de la concentración de ácido úrico en ambos músculos del brazo y en el

plasma, sugiriendo la activación de la vía de la XO *(508)*. Se ha visto que la hipoxantina y la xantina en sangre aumentaron dramáticamente en sujetos humanos después del ejercicio físico intenso *(177)*. Además se ha visto que la actividad de la XO se aumentó hasta 10 veces en el plasma de ratas después de correr a altas intensidades hasta el agotamiento *(507)*. Y por último *Rasanen et al (510)* observaron que un ejercicio arduo aumentaba la producción peroxidativa y la actividad radical de la XO en el plasma de caballos.

No obstante, al ser el órgano más dañado por efecto de la peroxidación lipídica, los beneficios antioxidantes del *Phlebodium decumanum* en el corazón, quedan aquí demostrados al obtener en el tejido miocárdico un 10,2 % menos de ROOH y una menor y significativa ($p<0,05$) diferencia en la concentración de TBAR en los animales con suplemento de *Phlebodium decumanum* en comparación a las ratas extenuadas sin suplemento de PD.

No podemos dejar de mencionar que sus efectos antioxidantes también son cuantificables en la diferencia obtenida de un 32,4 % menos de concentraciones de TBAR en las ratas S+PD en comparación a sus pares sedentarias sin suplemento alimenticio de PD.

Se ha informado que la sola deficiencia de vitamina E o su interacción con el ejercicio también puede incrementar la producción de radicales libres, acompañada por una serie de desordenes celulares como la peroxidación lipídica, pérdida del reticulum sarcoplasmático y, la desconexión mitocondrial. *(500)*.

5.3. ANTIOXIDANTES PLASMA

5.3.1 Tocoferol (VE), Retinol (VA), Coenzima Q_9 (CoQ_9)

Las concentraciones plasmáticas de antioxidantes observaron cambios, que en muchos casos fueron significativos. En el caso del tocoferol (VE), ambos grupos de ratas extenuadas evidenciaron las concentraciones más bajas de este antioxidante, siendo estas diferencias significativas ($p<0,05$) en comparación a la más alta obtenida en el grupo de animales sedentarios (S) que obtuvieron una concentración promedio de 18,3 μg/ml de plasma.

Esta diferencia fue de un 79,8 % menos de tocoferol plasmático en el grupo de animales extenuados con *Phlebodium decumanum,* aunque no se observaron tampoco diferencias estadísticas entre ambos grupos de animales extenuados. Sin embargo, se apreció un 53,9 % menos de tocoferol plasmático en los animales con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum.*

Estos resultados de la VE fueron parecidos a los hallados en el retinol (VA), que también mostró una disminución significativa ($p<0,05$) en las concentraciones de los grupos de animales extenuados físicamente.

La mayor concentración de este antioxidante se encontró en los grupos de animales sedentarios (S) con un promedio de 392,7 ng/ml de plasma en comparación a los dos grupos de ratas extenuada físicamente.

A pesar de no encontrarse diferencias estadística entre ambos grupos de ratas extenuadas, la diferencia porcentual de estos dos grupos fue de 16,8 % menos de retinol en el plasma, obtenido en el grupo de ratas llevadas hasta la extenuación con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum*.

Esta disminución de tocoferol y retinol en el plasma sanguíneo en los grupos de animales extenuados y en especial en los que tomaban *Phlebodium decumanum,* quizá se explique por las aumentadas concentraciones de estos antioxidante encontrados en las membranas mitocondriales de los animales sometidos a esfuerzos físicos intensos y que se alimentaban con *Phlebodium decumanum.*

En nuestro estudio se observó que las concentraciones más altas de VE en la membrana mitocondrial fueron obtenidas en primer lugar en el hígado, luego en el músculo esquelético y por último en el corazón. Su importancia radica en que los tocoferoles actúan como la primera barrera defensiva contra los radicales lipofílicos *(576)* protegiendo a las membranas celulares de las agresiones de los radicales libre**.**

En el caso de la VA las concentraciones en orden de importancia fue, primero en el músculo miocárdico, seguido por el hígado y por último el músculo esquelético. Las concentraciones más elevadas en ambas vitaminas antioxidantes, en los diferentes órganos, se encontraron en los animales con ingesta de *Phlebodium decumanum.*

Otro antioxidante medido en el plasma fue la coenzima Q_9 en ratas (CoQ) que en su forma reducida es considerada un antioxidante *per se (245)* o por su capacidad de reciclar tocoferol o VE *(246),* además de ser un constituyente importante de la cadena de transporte de electrones.

En sus concentraciones no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los cuatro grupos de animales. La concentración más alta de CoQ_9 de 202.3 ng/ml de plasma fue hallada en los animales sedentarios (S), evidenciando una diferencia porcentual de 30,7 % menos de este antioxidante en comparación a los animales extenuados (E). También

observamos una ligera disminución plasmática de CoQ_9 en los dos grupos de animales extenuados físicamente y, un incremento de sus concentraciones en las membranas mitocondriales, que fue mayor en el miocardio, seguido del hígado y, por último del músculo esquelético, en todos aquellos animales suplementados con *Phlebodium decumanum.*

Estos hallazgos muestran que uno de los mecanismos de adaptación para prevenir el daño oxidativo en las membranas mitocondriales es la acción selectiva de estos antioxidantes para la protección de los diferentes tejidos. Su acción protectora parece depender del órgano y del momento en que fueron medidos, por lo que quizás la acción del *Phlebodium decumanum* sea facilitar la movilización de estas concentraciones de antioxidante desde el plasma a las membranas mitocondriales para su protección ante el daño inminente por peroxidación lipídica que induce el ejercicio físico extremo.

5.4. ANTIOXIDANTES EN MEMBRANA MITOCONDRIAL.

5.4.1. TOCOFEROL (VE) en hígado

A pesar de las altas concentraciones de ROOH encontradas en el hígado, una de sus defensas antioxidantes no enzimática, el tocoferol (VE), que es el primer antioxidante que interviene en la interrupción de la reacción que desencadena la peroxidación lipídica en las membranas celulares, no sufrió cambios significativos ($p<0,05$) en sus concentraciones en el tejido hepático, en ninguno de los dos grupos de animales sometidos al programa de extenuación física con o sin PD en comparación a las ratas sedentarias. De igual forma, tampoco se observó cambios en las concentraciones de VE, en ninguno de los cuatro grupos de animales con o sin PD.

En este órgano se obtuvieron las concentraciones más altas de tocoferol en comparación al músculo esquelético y cardíaco, lo que coincide con lo informado por otros autores con relación a que el ejercicio agudo no parece reducir el contenido de VE en diversos tejidos *(549)***.** No obstante, en otros trabajos se ha demostrado que la concentración de VE disminuye en el músculo esquelético, cardíaco y en el hígado después de un entrenamiento físico muy intenso *(550)(551).* Estos cambios fueron aún más dramáticos cuando los niveles de VE fueron expresados por μg/mg de proteína mitocondrial *(552)*

Sin embargo, en nuestros resultados las concentraciones de VE expresadas tanto en μg/mg de proteína mitocondrial y μg/g de órgano fresco no mostraron ninguna tendencia al cambio como respuesta al ejercicio físico extenuante y crónico a las 24 horas después del ultimo episodio de esfuerzo, ya que posiblemente la presencia de concentraciones adecuadas permitiría una efectiva acción antioxidante en los lípidos de las membranas.

Se sabe que cuando un radical peróxilo colisiona con esta vitamina, se convierte en un hidroperóxido hiporreactivo, mientras que la VE al donar un electrón y oxidarse se transforma en un radical de VE (ChrO) que también es hiporreactivo y puede recuperar su estado original de VE (ChrOH) al reaccionar con un reductor, o seguir nuevas reacciones al combinarse con un radical peróxilo, alcóxilo o con otro radical de VE formando productos inocuos *(219)*.

En estudios donde se ha medido el aumento de radicales libres (RL) en el hígado de animales (ratas macho *Long Evans*) sometidos a ejercicio progresivo y extenuante, ya sea con niveles normales de VE o deprivados de ella *(553),* se les midió el tiempo de agotamiento, por medio de un test de resistencia realizado dos días después del ejercicio físico, siendo sacrificadas al término de dicho test. Se pudo observar por medio de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en muestras de homogeneizado de tejido hepático, un aumento de los RL de 3 a 4 veces en los animales con deficiencia de VE. Adicionalmente, se determinaron índices de control respiratorio mitocondrial (ICRM), encontrándose que sus valores fueron menores al finalizar el ejercicio, indicando cierto desacoplamiento inducido por el ejercicio. Además, la capacidad de adaptación fue inferior en los animales con dieta deprivada de VE. Estos resultados son consistentes con un modelo de ejercicio en el cual se generan RL, probablemente a nivel de la mitocondria, con un subsecuente daño a las membranas con alteración de su permeabilidad, por peroxidación lipídica.

5.4.2 Tocoferol (VE) en músculo esquelético.

Contrariamente a los resultados obtenidos en hígado, hemos observado cambios significativos ($p<0,05$) en la concentración de tocoferol (VE) en el tejido muscular. Esta vitamina antioxidante liposoluble observó su mayor

concentración en las membranas mitocondriales de los músculos esqueléticos en los animales extenuados (E+PD) versus los sedentarios. Quizá este aumento de las concentraciones de estas vitaminas antioxidantes explique su disminución en el plasma sanguíneo, al encontrase una menor concentración de VE en el plasma en ambos grupos de ratas extenuadas versus las ratas sedentarias, haciéndose significativo ($p<0,05$) este aumento de VE del grupo de ratas extenuadas (E+PD) al compararlas con los dos grupos de animales sedentarios.

Al expresarse las concentraciones de tocoferol en μg/mg de proteína de membrana mitocondrial de músculo, no se observaron diferencias estadísticas ($p<0,05$) entre ambos grupos de ratas extenuadas y ambos grupos de ratas sedentarias, aunque sí se observó una menor concentración de tocoferol en ambos grupos de ratas sin suplemento alimenticio de PD. En los grupos de ratas extenuadas (E) versus E+PD la diferencia fue 31,4 % menos de VE y de un 47,8% menos en el grupo de animales sedentarios en comparación los animales del grupo S+PD.

Sin embargo, cuando éstas son expresadas en μg/gramos de órgano fresco, aunque siguen siendo menores estas concentraciones en los animales sin PD, las diferencias entre ambos grupos de animales extenuados son estadísticamente significativas ($p<0,05$), consignándose una mayor concentración de tocoferol en los animales con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum.*

Estos resultados nos plantean la necesidad de valorar el efecto del *Phlebodium decumanum* ante la menor elevación de los biomarcadores de peroxidación lipídica y la mejor protección antioxidante, induciendo el aumento de las concentraciones de tocoferol como respuesta al estrés oxidativo provocado por el ejercicio físico extenuante. Ante estas evidencias sería muy importante investigar sobre los mecanismos de protección del PD contra el daño oxidativo a nivel muscular, ya que, si bien es cierto que las concentraciones de VE expresadas en μg de proteína de membrana muscular en el grupo de ratas extenuadas sin PD (E) fueron ligeramente inferiores en un 31,4% en comparación al grupo E+PD, estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, las diferencias se hicieron significativas entre ambos grupos de ratas extenuadas hasta el agotamiento máximo ($p<0,05$) cuando se expresaron como μg/gramo de órgano fresco.

Se ha informado que la suplementación con VE en animales disminuye en forma marcada el daño oxidativo a las proteínas de los músculos sometidos a esfuerzo *(566).* Así, en un estudio realizado con dos grupos de animales, uno de ellos con a una dieta con altas dosis de VE (10.000 UI/kg dieta) y de aceite de palma rico en alfa-tocoferol y tocotrienol (7000 mg tocotrienol/kg dieta), y otro

con una dieta control con niveles normales de alfa-tocoferol (30UI/kg dieta), después de cuatro semanas tras la que parte de los animales de cada grupo fue sometido a ejercicio extenuante en una plataforma circulante, midiendo la concentración de grupos carbonilos proteicos en el músculo gastronemio y en sangre por el método de *Levin et al (567)*, en las ratas alimentadas con la dieta control el contenido de carbonilo proteico del gastronemio aumentó el 17,23 % como resultado del ejercicio, pero en los animales que recibieron suplemento de VE, el aumento se mantuvo entre 8,27 % y 5,78 %. En comparación con los animales alimentados con dieta control, los suplementos con tocoferol y tocotrienol tuvieron un contenido de carbonilos proteicos significativamente inferior (-32,3 y -19,8%). Asimismo, los animales suplementados con VE que fueron ejercitados tuvieron contenidos de carbonilos proteicos más bajos comparados con animales alimentados con dieta normal. No se observaron cambios en los niveles sanguíneos de carbonilos proteicos, ya sea con el ejercicio o con la suplementación de antioxidante. Los resultados indican que la suplementación con VE, sea en su forma de tocoferol o tocotrienol, disminuye el daño oxidativo proteico del músculo. De hecho, los niveles musculares de carbonilo proteico en los animales suplementados con VE y sometidos ejercicio fue siempre menores que en los animales sedentarios que recibieron dieta control.

BIBLIOTECA VIRTUAL

5.4.3 Tocoferol (VE) en corazón.

En nuestro estudio hemos encontrado cambios significativos ($p<0,05$) en la concentración de vitamina E (VE), en el tejido cardiaco. En este órgano encontramos los valores más bajo de tocoferol en comparación al músculo esquelético e hígado, lo que podría reflejar una mayor susceptibilidad de este órgano a la peroxidación lipídica durante el ejercicio extenuante, dada la disminución de la concentración en la membrana mitocondrial de esta vitamina antioxidante.

Las concentraciones de VE del tejido miocárdico de los animales extenuados sin PD mostraron los valores más bajos, hasta un 59,2% menos en comparación a los grupos de animales extenuados físicamente con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum,* y un 69,3 % en comparación al promedio mas alto obtenido en los grupos de ratas sedentarias con ingesta de PD.

La menor concentración de antioxidantes en las membranas mitocondriales del corazón de las ratas extenuadas físicamente (E) se explica por la estrecha relación con el daño peroxidativo inducido por el ejercicio intenso, al encontrarse altas concentraciones de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico y de los hidroperóxidos en el tejido miocárdico

Goldfard et al (577), en un estudio realizado en una muestra de 64 ratas *Sprague Dawley*, informaron de los efectos de la VE sobre el estrés inducido por el ejercicio en el miocardio. Las ratas fueron divididas en dos grupos con o sin VE, y fueron sometidas a una carrera sobre la cinta rodante durante 5 semanas con sesiones de entrenamiento de 1 hora a una velocidad de 21m/min., y con una pendiente de un 12%. El marcador oxidativo utilizado fue la producción de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). El estudio concluyó que la vitamina E atenuó la producción de TBARS en el corazón en comparación a los animales sin ingesta de VE.

Distintos investigadores han comprobado el aumento del tocoferol (VE) y del ácido ascórbico (AAC) poco después de culminar una actividad deportiva, lo que se vincula con la elevación del cortisol plasmático resultante de la intensidad del ejercicio practicado *(565)*.

Sin embargo, todavía existe una disparidad de resultados entre los nuestros y los encontrados en la bibliografía, que podría deberse al momento en el que se evaluaron las concentraciones de antioxidantes, al tipo de actividad realizada, al grado de entrenamiento o a factores ambientales entre otros.

5.4.4 Retinol (VA) en hígado

Otra vitamina antioxidante liposoluble estudiada fue el retinol (VA) de la membrana mitocondrial del hígado. Los resultados en este órgano fueron parecidos a los obtenidos en el tocoferol al no evidenciarse en sus concentraciones variaciones estadísticamente significativas ($p<0,05$) en los cuatro grupos de animales.

En este estudio el tejido hepático evidenció la segunda más alta concentración de retinol en las membranas nitocondriales en comparación a los otros dos órganos. Su concentración más incrementada de 38,4 ng/mg de proteínas encontrada en los animales extenuados con suplemento alimenticio de PD, correspondió a un 7,1 % menos de VA en comparación a la tasa más alta de retinol obtenida en el músculo cardíaco.

Si bien es cierto, los resultados de este antioxidante fueron homogéneos en los diferentes grupos de ratas, la mayor concentración de retinol obtenido en el grupo E+PD fue de un 18 % más que el grupo de animales extenuados sin ingesta suplementaria de PD.

5.4.5. Retinol (VA) en músculo esquelético

En el músculo esquelético se observaron los valores más bajos de retinol en comparación a los otros dos órganos, con una concentración de un 31,2 % menos

de vitamina A en relación al corazón y en un 26,4% menos en comparación al tejido hepático.

Tampoco se evidenciaron diferencias estadísticas ($p<0,05$) entre las medias muéstrales de los cuatro grupos grupo de ratas. Sin embargo, se observó una ligera tendencia en un 18,8 % de incremento en las concentraciones de VA en el grupo E+PD en comparación al grupo de ratas extenuadas sin suplemento de PD.

5.4.6 Retinol (VA) en corazón

A pesar de la menor concentración de tocoferol hallado en este órgano, en el músculo cardíaco se obtuvo la mayor concentración de retinol en comparación a los otros dos órganos. Su concentración más alta fue encontrada en los animales agotados físicamente con suplemento alimenticio de PD, con 41,3 ng/mg de proteínas de membrana mitocondrial de músculo cardíaco y, con un incremento no significativo ($p<0,05$) de un 15,1 % más de retinol en comparación al segundo valor más alto encontrado en las ratas extenuadas sin PD. Posiblemente, la VE, al ser la primera barrera antioxidante en la membrana mitocondrial, sufrió en este órgano una depleción proporcional al daño oxidativo inducido por el ejercicio físico extenuante, asumiendo la protección de estas membranas mitocondriales la VA, cuyo aumento pudo ser inducido por efecto del *Phlebodium decumanum.*

5.4.7 Coenzina Q_9 en hígado

La CoQ_{10} posee un papel importante en la prevención de la iniciación o propagación de la peroxidación lipídica en las lipoproteínas de membrana, como también adicionalmente, se ha evidenciado *in vitro* su protección sobre la oxidación de las bases nucleicas de ADN *(554),* así como su función en el transporte de electrones en la cadena mitocondrial (ETC).

A pesar de que las concentraciones de CoQ_9 encontradas en el plasma fueron homogéneas ($p<0,05$). para los cuatro grupos de animales, en la membrana mitocondrial las concentraciones promedios de CoQ_9 en el tejido hepático se encontraron aumentada a las 24 horas post ejercicio, observándose a este nivel el segundo incremento más alto obtenido entre los tres órganos.

Entre estos órganos, el miocardio fue el que evidenció las concentraciones más incrementadas de CoQ_9, seguido por el tejido hepático (32,1 % menos). Esta diferencia fue obtenida en ambos grupos de ratas E+PD, quienes observaron los niveles más altos de dichas concentraciones en el corazón

Al establecer comparaciones en las concentraciones de CoQ_9 entre los distintos grupos de animales, se evidenció diferencias significativas ($p<0,05$) en la mayor concentración obtenida en el grupo E+PD en comparación al valor promedio más bajo encontrado en los dos grupos de ratas sedentarias y, una diferencia de un 13,4% más con el grupo de ratas con ejercicio extenuante sin PD (E).

La CoQ_{10} es un constituyente importante en la cadena respiratoria mitocondrial que por su capacidad de óxido-reducción puede tener efectos protectores sobre el hígado y diferentes tejidos *(554)*. *Jensen et al (555)* y *Hinckle et al.(224)* indicaron que la cadena respiratoria mitocodrial era capaz de producir H_2O_2. *Loschen et al (557)* mostró la formación de H_2O_2 en el corazón de la mitocondria de paloma y su relación con el estado metabólico mitocondrial, mientras que *Boveris et al (558)* determinaron las propiedades generales de la producción mitocondrial de H_2O_2 en mitocondrias de hígado de ratas.

La cadena respiratoria está compuesta por una serie de transportadores de electrones capaces de experimentar cambios reversibles en su estado redox *(559)*. La ubiquinona (CoQ) es el colector de la mayoría de los electrones provenientes de los procesos celulares oxidativos *(560)*. Los electrones son transferidos a la ubiquinona por una serie de flavoproteínas dehidrogenasas, actuando de transportador de electrones desde el NAD y la succinato dehidrogenasa y el sistema de citocromos *(561)*.

Los resultados hasta aquí obtenidos en el tejido hepático en nuestro estudio nos muestra que, ante la aumentada presencia de hidroperóxidos ROOH y en menor medida de TBAR, ambos biomarcadores de peroxidación lipídica en este órgano muestran una recuperación rápida de la defensa antioxidante no enzimático, al hallarse mayores concentraciones de tocoferol, retinol y CoQ_9 que las encontradas en el músculo esquelético a las 24 horas post ejercicio extenuante.

Las menores concentraciones de especies reactivas del oxígeno y las aumentadas concentraciones de antioxidantes fueron halladas en el hígado en los animales con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum.* Esto nos hace pensar que este inmunomodulador tiene un efecto protector e inductor de antioxidantes hacia las membranas mitocondriales en respuesta a la peroxidación lipídica inducida por el ejercicio físico intenso.

5.4.8. Coenzima Q_9 en músculo esquelético

En el músculo esquelético las concentraciones de CoQ_9 fueron en un 58,4% menores en la membrana mitocondrial en comparación a las más altas encontradas en el corazón.

Sin embargo, también fueron significativos ($p<0,05$) los hallazgos encontrados en las concentraciones de CoQ_9 en el músculo esquelético de las ratas llevadas hasta la extenuación física con suplemento alimenticio de PD (E+PD) en comparación a sus pares con ejercicio y sedentarias. En este grupo se evidenció una concentración significativamente mayor de estas concentraciones en comparación a los grupos de ratas sedentarias tanto expresado en μg/mg de proteínas o en μg/g de órgano.

A pesar de la ligera disminución de estas concentraciones en el plasma sanguíneo en los grupos de animales extenuados, en la membrana mitocondrial se observaron en ambos grupos de ratas ejercitadas físicamente, concentraciones de CoQ_9 más elevadas en comparación a las ratas sedentarias. La mayor concentración obtenida fue, en el grupo de animales E+PD con un 49,3 % más de coenzima Q_9 en comparación a los grupos de ratas sedentarias sin suplemento de *Phlebodium decumanum.*

Son comparables estos resultados, con los de *Gohil. K et al (570)* quienes informaron que el entrenamiento de resistencia conduce a un aumento adaptativo en el contenido de ubiquinona en el músculo de fibras rojas de cuadriceps y soleo en animales de experimentación.

En nuestro estudio no se alcanzó diferencias significativas entre el grupo (E) y los grupos de ratas sedentarias, al evidenciarse en él las concentraciones mas bajas de CoQ_9 en μg/mg de proteínas de membrana muscular entre los dos grupos de animales con ejercicio extenuante.

La importancia de estos resultados radica en que aparte de prevenir la CoQ_{10} en humanos y la CoQ_9 en las ratas la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica, estas moléculas también son parte constituyente de la cadena respiratoria mitocondrial, donde actúa como un transportador de electrones entre el NADH y la succinato dehidrogenasa y el sistema de citocromos *(571).*

Se ha visto además, en situación in vitro, secciones de tejidos de animales alimentados con coenzima Q_{10} que fueron más resistentes a la peroxidación lipídica inducida por el hidroperóxido de tertbutilo que las de tejidos correspondientes a animales no suplementados con CoQ_{10} *(572).* La suplementación con CoQ_{10} disminuyó la liberación inicial de creatina kinasa y

lactato dehidrogenasa en ratas a las que se hizo descender por un plano inclinado *(573)* pero no tuvo efectos sobre la liberación de creatina kinasa en humanos sometidos a ejercicio extenuante en cicloergómetro *(574)* Estos interesantes resultados invitan a profundizar en la investigación sobre la acción antioxidante de la CoQ_{10} y sus efectos en el ejercicio.

Los resultados hasta aquí encontrados nos permiten señalar que, ante una similar presencia en las concentraciones de hidroperóxidos (ROOH) y de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR) en las membranas mitocondriales de los músculos esqueléticos en comparación al hígado y corazón, estos tejidos están muy expuestos a los efectos de la peroxidación lipídica, observándose en ellos una recuperación más lenta ante las disminuidas concentraciones de retinol y CoQ_9 obtenidas a las 24 horas post-ejercicio.

Al parecer, estos tejidos son los más resistentes por sus características funcionales a la presencia de ROS y a los daños oxidativos, a pesar de haber evidenciado concentraciones de tocoferol ligeramente incrementadas en los tejidos de los músculos esqueléticos en comparación a los otros dos órganos.

Las mayores concentraciones de estos antioxidantes en las membranas mitocondriales del tejido del músculo esquelético fueron obtenidas en los grupos de animales con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum*.

5.4.9 Coenzima Q_9 en corazón

Sin embargo, tal como se ha mencionado anteriormente en este estudio las concentraciones de CoQ_9 en las membranas mitocondriales del corazón fueron las más altas obtenidas en comparación a los otros dos órganos estudiados. Su diferencia fue de un 58,4% más de coenzima Q_9 en comparación a las concentraciones más bajas obtenidas en el músculo esquelético.

La mayor concentración de 6,73 μg/mg de proteínas fue obtenida en las ratas extenuadas con PD (E+PD) con una diferencia en las concentraciones CoQ_9 de un 43,3% ($p<0,05$) mas alta cuando se expresaban por μg/mg de proteína de membrana mitocondrial en comparación al grupo E, y de un 52,4% en μg/gramo de órgano en comparación a las concentraciones más altas registradas en al grupo de animales sedentarios con suplemento alimenticio de PD.

Estos hallazgos son de mucha importancia dada la observación de que la mejoría mecánica cardiaca y la recuperación metabólica con la administración de CoQ_{10} ha demostrado que ésta atenúa la sobrecarga intracelular de calcio *(583)(584),* que suprime la fosforilación oxidativa en la mitocondria. *Matsumoto el al (585),* realizaron un estudio de microscopía electrónica que reveló niveles marcadamente bajos de fosfato de calcio en la matriz intramitocondrial de células de corazones previamente tratados con CoQ_{10}, lo que pone en evidencia que esta enzima previene la sobrecarga de calcio.

Sin embargo, se ha documentado que las concentraciones de CoQ_{10} varían sustancialmente entre los distintos órganos siendo mayor en tejidos aeróbicos con alto metabolismo, y por tanto con mayor capacidad de producir radicales libres *(584).*

En nuestro estudio estos hallazgos son coincidentes con la literatura ya que las concentraciones de este antioxidantes fueron superiores en el corazón, por su alto metabolismo aeróbico, a las observadas en los otros dos órganos tanto expresado en µg/mg de proteína mitocondrial como por µg/g de órgano.

Estos resultados muestran que el corazón es uno de los órganos más afectado después del músculo esquelético por el estrés oxidativo inducido por el ejercicio extenuante, debido a las altas concentraciones de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR) y de hidroperóxidos (ROOH), mostrando una marcada depleción de las concentraciones de tocoferol en la membrana mitocondrial.

Sin embargo, este órgano cuenta por su importancia y funcionalidad con mecanismos adaptativos más eficientes que permiten una mejor protección antioxidante, permitiendo al *Phlebodium decumanum* movilizar mayores concentraciones de retinol y coenzima Q_9 a las 24 horas del termino del último episodio de esfuerzos crónicos.

5.5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE

5.5.1 Superóxido dismutasa (SOD) de hígado

Los organismos superiores han ido desarrollando a través del tiempo un eficiente sistema antioxidante. La presencia o la ausencia de daños oxidativos inducidos por el ejercicio físico no depende sólo de la presencia de radicales libres, sino también de la capacidad defensiva de mecanismos antioxidantes *(512).* Los ejercicios agudos repetidos han demostrado incrementar la actividad

enzimática antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD) en el hígado *(513)(514)(515)(516)(517)*en el músculo esquelético *(514)(515)(516)(518)(519),* en el corazón *(504)(520),* y en las células rojas de la sangre *(520)(522).*

La superóxido dismutasa (SOD) en este estudio mostró su máxima actividad en el tejido hepático, en comparación a la obtenida en el músculo esquelético y miocárdico.

La actividad máxima fue de 17,6 U/mg de proteínas encontrada en el citoplasma del tejido hepático en el grupo de ratas con ejercicio hasta la extenuación sin PD (E). Este incremento significativo de la actividad SOD fue de un 26,2 % mayor que los valores más reducidos que correspondieron al grupo de ratas sedentarias (S) a las 24 horas después de la última sesión de ejercicio. La comparación con los animales del grupo que hacían ejercicio extenuante con suplemento alimenticio de PD no resultó significativa.

El incremento de la activación de esta enzima se explica por su efecto neutralizante de los radicales superóxido (O_2.-), como primera barrera antioxidante enzimática para detener la reacción en cadena iniciada por el ejercicio extenuante en el hígado, después de 24 horas post ejercicio. Su función es la descomposición del O_2.- para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno *(142).*

Estos resultados dejan en evidencia un incremento del 17,5% en la actividad de la SOD en el grupo E en comparación con el E+PD, reflejando un mayor estrés oxidativo en el primer grupo que precisó mayor actividad de esta enzima frente al incremento en la producción de anión superóxido.

Los resultados obtenidos en este órgano, con un incremento significativamente mantenido de hidroperóxidos (ROOH) y en de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR) en comparación a los otros tejidos, muestran la mayor exposición a la peroxidación lipídica y el mayor riesgo de sufrir daño oxidativo inducido por el ejercicio físico extenuante.

Sin embargo, el hígado parece ser uno de los órganos con mayor capacidad recuperativa, como lo demuestran las altas concentraciones de antioxidantes encontradas a las 24 horas post-ejercicio. Según nuestros resultados, la respuesta de éstas defensas estuvo representada en primer lugar por el tocoferol, dado el aumento de sus concentraciones en la membrana mitocondrial, y por la superóxido dismutasa, que incrementó su actividad citoplasmática, finalizando la defensa antioxidante a través de la acción del retinol y la CoQ_9

La acción del *Phlebodium decumanum,* según nuestros resultados, parece potenciar los mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, como lo refleja la disminución de las concentraciones de los biomarcadores de peroxidación lipídica.

5.5.2 Superóxido dismutasa (SOD) corazón y músculo esquelético.

En este estudio no observamos diferencias significativas en la actividad enzimática citoplasmática de la SOD de músculo y corazón al comparar los cuatro grupos de experimentación, medida que se realizó a las 24 horas del término del programa de trabajo físico. No obstante, a que en estos órganos músculo esquelético y corazón también se evidenciaron daños oxidativos por un aumento significativo de los biomarcadores de peroxidación lípidica como ha quedado demostrado anteriormente, ante el incremento de la producción de ROS inducido por el ejerció físico intenso y crónico.

En nuestros resultados hemos hallado que en el tejido miocárdico se obtuvo la menor actividad de SOD de los tres órganos, con un 9,7 % menos de actividad en comparación al nivel máximo encontrado en el hígado.

La concentración más alta de SOD en el corazón fue de 15,9 U/mg de proteínas y se obtuvo en el grupo de ratas extenuadas con PD, evidenciándose a partir de esta actividad un 13,9 % menos en relación al grupo de animales extenuados sin suplemento alimenticio de PD:

No obstante, existen una gran variedad de estudios que señalan, que el ejercicio agudo incrementa la actividad de CuZnSOD tanto como del MnSOD en el músculo y corazón, siendo dicha activación provocada por el incremento de la producción del radical anión superóxido (O_2.-) durante el ejercicio *(191).* También se ha reportado un incremento significativo de la actividad del SOD en el músculo esquelético después de un entrenamiento físico *(520).*

En este estudio hemos observado en el tejido muscular una actividad enzimática de SOD similar a la encontrada en el tejido hepático, con una diferencia de sólo un 2,3 % menos de actividad en comparación a la encontrada en el citoplasma del tejido hepático. La mayor actividad de 17,2 U/mg de proteínas fue obtenida en el grupo de ratas extenuadas con PD, con un 17.5 % más de actividad de SOD que el grupo de ratas extenuadas sin PD, y en un 30,9 % a la concentración más baja obtenida en el grupo de ratas sedentarias con *Phebodium decumanum.*

Sin embargo, otros estudios coinciden con los resultados aquí encontrados al no detectar una activación del SOD en el músculo y corazón como adaptación

después de un entrenamiento físico, aún cuando se han usado modelos similares de entrenamiento, pero desconociéndose el tipo de ejercicio y el tiempo de medición del SOD realizado en dichos estudios *(523)(524)(525)*. La discrepancia de estos resultados puedan ser explicadas además por las diferentes isoenzimas SOD estudiadas, los diferente análisis del SOD usado, al protocolo utilizado en cuanto a las intensidades, frecuencias, tipos de ejercicio y, tipo de fibras estudiadas *(474)*.

En otros estudios, cuyo objetivo era verificar si el incremento de la actividad del SOD y de la glutation peroxidasa (GPX) en la respuesta al ejercicio agudo eran causadas por una activación o una modificación de la expresión génica *(474)*. Se midió la cantidad relativa de mRNA para varias de las enzimas de los músculos esqueléticos *Oh-ishi et al (526)* informaron de un downregulation significativo en los niveles de mRNA para ambas isoenzimas CuZn y MnSOD en el músculo soleo de ratas no entrenadas, lo que no fue observado en ratas entrenadas.

Se han investigado recientemente los efectos de un ejercicio prolongado en la cantidad de mRNA en las enzimas antioxidantes de músculos de ratas *(527)*. La cantidad de mRNA de CuZnSOD, de MnSOD y de catalasa (CAT) no fue alterada por el ejercicio. Sin embargo, esta actividad hizo disminuir los niveles de GPX, mRNA en un 21,6% y 60,8% en DVL y SVL respectivamente, mostrandose que, a pesar del incremento de la actividad de la enzima por un ejercicio agudo y extenuante, pueden disminuir la cantidad de mRNA, de GPX, de MnSOD y de CuZnSOD.

En deportistas se ha observado un aumento de la actividad basal del SOD en eritrocitos inmediatamente después del esfuerzo *(471)*. Estos resultados, así como los de otros estudios *(78)(88)* sugieren que el incremento de la actividad enzimática (SOD) como respuesta adaptativa al esfuerzo se ve favorecida como mecanismo de protección frente al daño oxidativo en deportistas que realizan una actividad física continuada.

Todo estos resultados observados en conjunto muestran distintas adaptaciones antioxidativas de SOD según los tejidos estudiados y, a nivel muscular, según los diferentes componentes de las fibras musculares evaluadas, lo que no nos permite comparar nuestros resultados con los de otros estudios. La activación enzimática selectiva como respuesta al ejercicio físico ya ha sido informada por otros autores *(520)*

En nuestro estudio ha quedado de manifiesto que, a pesar de no existir una diferencia con significación estadística, existen diferencias porcentuales importantes en la actividad del SOD entre los cuatro grupos de animales, que en el caso de la actividad de la SOD mostró una homogeneidad en los tres órganos estudiados.

Los resultados observados en los grupos que tomaron el PD muestran una tendencia a mantener una aumentada y más prolongada actividad de la SOD en el hígado como medio de prevenir los daños producidos por el incremento del estrés oxidativo.

5.5.3 Catalasa (CAT) hígado y corazón

Otro de los sistemas antioxidante que estudiamos, por su capacidad para eliminar el incremento de radicales libres inducido por ejercicio físico, fue la catalasa (CAT) citoplasmática. Este enzima evidenció una actividad enzimática similar prácticamente en corazón e hígado en todos los grupos de animales, pero no así en el tejido muscular.

En el hígado se observaron los niveles de actividad más bajos de esta enzima (CAT) (84,2%) en comparación a los del músculo esquelético, cuya actividad citoplasmática fue la más elevada. Desde nuestro punto de vista, la principal actividad enzimática antioxidante como defensa frente al aumento del estrés oxidativo provocado por el ejercicio físico la realiza, hasta las 24 horas de recuperación, la superóxido dismutasa, como lo demuestran sus actividades aumentadas en el tejido hepático.

Los resultados de la actividad de CAT en el corazón fueron un 65.1% menores en comparación con el músculo esquelético, y un 56,3 % mayores en relación a la actividad observada en el tejido hepático. Además de ello, los resultados de la actividad de CAT en miocardio fueron muy homogéneos en los diferentes grupos de animales estudiados, aunque, tanto en el hígado como en el corazón, hemos observado una ligera tendencia a aumentar la actividad CAT en los animales con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum.*

Por contra a los resultados en población sana, como en nuestro estudio o en los citados anteriormente, los niveles de actividad CAT en corazones de pacientes con insuficiencia cardiaca debida a miocardiopatía dilatada o isquémica, han mostrado valores muy elevados probablemente relacionados con el aumento muy importante del estrés oxidativo en estos pacientes. Así, en un estudio realizado con este tipo de pacientes se analizaron niveles de mRNA de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), cobre-zinc SOD, GPX y catalasa

(CAT), según la técnica de *Western Blot*. Los resultados mostraron que los niveles de mRNA fueron similares para todos los grupos, excepto para la CAT que se hallaban aumentados (hasta un 123%) en las muestras de miocardiopatía dilatada, y en un 93% en la miocardiopatía isquémica ($p<0,05$). Estos valores se asociaron a un aumento del 124% y del 117% en la actividad de la catalasa para la miocardiopatía dilatada y la isquémica respectivamente. La conclusión de los autores era que existe un estrés oxidativo importante en estos corazones y que esta condición produce un aumento de la regulación de la expresión genética de la CAT como mecanismo compensador, desconociéndose el motivo por el cual no se observa la misma respuesta en las demás enzimas antioxidantes *(564)*

Sin embargo, los estudios que se han desarrollado en población sana no han mostrado ningún cambio en la actividad CAT relacionada con el estrés oxidativo provocado por el ejercicio físico *(497)(529)(530),* y en otros incluso, se ha reportado una disminución de su actividad de los niveles básales al termino del esfuerzo. *(531)(532)*.

5.5.4 Catalasa (CAT) músculo esquelético

Hemos encontrado también una actividad significativamente incrementada de la CAT después de 24 horas en el músculo esquelético en comparación a los otros dos órganos. El valor más alto de actividad obtenido fue de 1,83 $seg.^{-1}.mg^{-1}$ en el grupo de ratas extenuadas sin suplemento de PD, a un nivel de significancia de un 5%.

Recordemos que la CAT actúa como mecanismo defensivo a la peroxidación lipídica, actuando frente al peróxido que flota libremente en las zonas hidrosolubles de las células, para impedir que el H_2O_2 afecte a las mitocondrias o al ADN. transformándolo en una molécula de H_2O y otra de O_2.

Este hallazgo concuerda con otros estudios que han mostrado un aumento de la actividad de la CAT en el músculo DVL después de un ejercicio agudo de alta intensidad hasta el agotamiento *(514)(515)*. Sin embargo, otros investigadores *(115)(116)*.no han observado ningún aumento de esta enzima. En humanos se ha visto que ésta se encuentra basalmente aumentada en deportistas en comparación a controles, así como una disminución al termino del ejercicio *(471)*.

Los resultados aquí encontrados coinciden con los hallazgos de varios autores en el aumento de la actividad de la CAT en el músculo esquelético *(526) (533)(534)(535)* El incremento de la actividad de la CAT en los animales después de 24 horas puede ser atribuible a la magnitud del daño crónico inducido por el ejercicio físico intenso, ya que la actividad enzimática fue

significativamente mayor ($p<0,05$) entre este grupo de animales ejercitados hasta la extenuación (E) y el grupo de ratas activas con suplemento alimenticio de PD (E+PD) y los dos grupos de animales sedentarios.(S y S+PD)

Quizás la activación más prolongada de esta enzima tenga por objetivo seguir neutralizando el daño excesivo generado por los radicales libres, producido por el ejercicio extenuante, al metabolizar la CAT el H_2O_2, proveniente de la descomposición del O_2- por la acción de la superóxido dismutasa.

A pesar de las controversias suscitadas en la bibliografía sobre el aumento de la actividad enzimática de la CAT como respuesta al entrenamiento físico *(474*), en nuestro estudio observamos aumentos significativos de la actividad CAT solamente en el grupo E, así como también el de las concentraciones de vitaminas antioxidantes y CoQ_9 en el grupo con suplementación con PD, como protectores frente al daño oxidativo producido por las altas concentraciones de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico y de ROOH. De este modo, se podría inferir la acción protectora del *Phlebodium decumanum* en los animales extenuados crónicamente, actuando sinérgicamente con la CAT en el citoplasma del tejido muscular en la detención de la acción en cadena iniciada por el anión superóxido (O_2.-) y a la conservación de una mayor concentración de antioxidantes liposolubles protegiendo las membranas celulares.

A las 24 horas de finalizar la última sesión de esfuerzo del programa de extenuación física, nuestros resultados señalan una menor variación de la actividad de las otras dos enzimas (SOD y GPX) en el tejido muscular, encontrándose valores homogéneos al comparar las medias muéstrales entre el grupo de ratas extenuadas y los otros dos grupos. Los efectos protectores del *Phlebodium decumanum* consiguieron diferencias significativas ($p<0,05$) en la actividad de la CAT 24 horas post-ejercicio en los músculos esqueléticos del grupo de animales agotados físicamente (E) comparados con sus pares activos con ingesta suplementaria de PD, que mostraron niveles significativamente más reducidos. Estos resultados son de especial trascendencia dado que en el músculo esquelético hemos encontrado valores que reflejan un mayor daño oxidativo, como son las elevadas concentraciones de ROOH y TBAR encontradas en el músculo esquelético que consignaron el segundo lugar en orden de importancia de su incremento en comparación a los otros dos órganos.

Parece ser que éste es unos de los tejidos mas expuesto y en el que se hace más evidente el daño oxidativo a las 24 horas post-ejercicio, al encontrarse una depleción importante en las concentraciones de retinol, CoQ_9 y en menor medida de tocoferol en las membranas mitocondriales del músculo esquelético. La

catalasa se ha mostrado como el enzima antioxidante más activa en la prevención del daño celular, junto con la superóxido dismutasa. Esto se apoya en el consenso de distintos estudios, que informan que el ejercicio agudo, y en menor escala el ejercicio crónico, puede activar ciertas enzimas antioxidantes sin sintetizar nuevas proteínas. El margen de protección puede estar limitado dependiendo de cada enzima y de los tejidos implicados *(528)*

En nuestros resultados se observa que las defensas antioxidantes tienden a incrementar su actividad, como también sus concentraciones por efecto del *Phlebodium decumanum,* permitiendo así una mayor protección y reparación ante el daño provocado por peroxidación lipídica inducido por ejerció físico crónico y extenuante.

5.5.5. Glutation peroxidasa (GPX) de hígado y músculo esquelético

Otra de las enzimas estudiadas fue la glutation peroxidasa (GPX) que junto a la glutation reductasa (GR) son las más importantes enzimas en el ciclo del glutation en su forma reducido (GSH) y del glutation oxidado (GSSG)*(542).*

Se ha comunicado *(494)* un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes GPX en el hígado y músculos, pero no en el corazón de ratas entrenadas. Por otro lado fue documentado que la totalidad de las concentraciones de antioxidantes aumentan en todos los tejidos de las ratas con entrenamiento, aunque en menor grado en el corazón. El aumento de la capacidad antioxidante en los tejidos ha sido encontrado en animales jóvenes con un régimen de entrenamiento regular *(494).*

Estos resultados sugieren que el efecto de protección del entrenamiento habitual es incrementar las defensas antioxidantes, aunque la concentración especifica de estos sistemas pueden verse afectados de manera diferente *(474)*.Los resultados encontrados por estos autores sobre los cambios de la actividad de esta enzima en el músculo esquelético después de un ejercicio agudo *(514)(515)(533)(539)* no coinciden con los resultados de nuestro trabajo, cuyo objeto de estudio fue llevar al sobreentrenamiento a estos animales.

Nuestros resultados indican cambios significativos de esta enzima a las 24 horas post ejercicio en el corazón, que fueron menos llamativos en el hígado y menos por último en el músculo esquelético.

En el hígado se observó la actividad más alta de esta enzima en el grupo de ratas extenuadas sin PD con un valor de 3,81 U/mg de proteínas, que representa un 35,8 % más de actividad que la más alta obtenida en el músculo esquelético.

La mayor diferencia de la actividad GPX encontrada en el hígado se evidenció entre el grupo de animales extenuados sin PD comparados con las ratas del grupo E+PD. Dicha deferencia significativa supuso un 68,6% de aumento de actividad en el grupo de animales sin suplemento de *Phlebodium decumanum*, observándose un mayor estrés oxidativo en el hígado de estas ratas. Esto demuestra aún más los efectos protectores antioxidantes del *Phlebodium decumanum*, dada la homogeneidad de la actividad enzimática GPX encontrada entre el grupo de ratas extenuadas con PD y ambos grupos de ratas sedentarias.

Pocos fueron los cambios observados en la actividad de la glutation peroxidasa en el tejido muscular en comparación a los otros dos órganos estudiados. El valor máximo encontrado fue de 2,38 U/mg de proteínas obtenido en el grupo de animales extenuados sin PD.

Las diferencias de los cambios adaptativos de la actividad de la GPX en el músculo esquelético no fueron significativas ($p<0,05$) en los cuatro grupos de comparación medidos a las 24 horas del termino del programa de extenuación física, quedando en evidencia que a pesar del incremento de la peroxidación lipídica, como lo muestra el aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno encontrada en este órgano, la actividad de esta enzima (GPX) fue similar entre los grupos con ejercicio extenuante en comparación a los grupos de animales sedentarios. Quizá, la actividad protectora de los antioxidantes no enzimáticos y de la SOD sobre el hígado y de la CAT sobre la formación de H_2O_2 en el músculo fue suficiente para su descomposición, protegiendo las mitocondrias y el ADN en el tejido muscular y hepático

Aunque la activación de la GPX ha mostrado una respuesta variable tras la realización de ejercicios agudos en varios tipos de músculos esqueléticos *(474),* se ha observado que la respuesta de la GPX es específica a la fibra muscular *(533)*. Así, se ha encontrado un aumento de la actividad de la GPX en función a la velocidad del tapiz rodante en los músculos DVL, SVL, pero no en el caso del soleo *(514)*. De igual forma, en un estudio realizado en animales de experimentación, a los que se les hicieron las medidas un día después a un ejercicio agudo de carrera sobre el tapiz rodante hasta el agotamiento, se observó un aumento de la actividad GPX en los músculos soleos pero no en los músculos tibiales de los animales *(509)*.

Diversos autores han realizado trabajos estudiando la actividad de la GPX en comparación a las otra enzimas, mostrando que es la que tiene una respuesta

adaptativa más sólida al entrenamiento *(518)(531)(526)(532)(540)(543)(544).* La adaptación de la GPX en el músculo es específica a la fibra de tipo 2a que es más sensible al entrenamiento. *Powers et al. (544)* observaron un incremento de un 45% en la actividad de la GPX en el músculo rojo gastrocnemius (tipo 2a) después de un entrenamiento de resistencia en ratas, mientras que los músculos soleo y la porción blanca del gastrocnemius no evidenciaron un efecto del entrenamiento.

No obstante, en otros estudios, no se han encontrado cambios de esta enzima en el músculo después del ejercicio agudo *(516)(536)(537)(538)* Aunque la GPX se expresa como una enzima uniforme en distintos compartimentos celulares, existe evidencia que la GPX en la mitocondria experimenta una mayor adaptación con el entrenamiento que la GPX del citosol en los músculos esqueléticos de ratas *(540).*

Leuwenburgh et al. (542) observaron un aumento del 62% en la actividad de GPX en el músculo de DVL como respuesta a un entrenamiento sobre el tapiz rodante, mientras que el soleo y el corazón no evidenciaron cambios por efecto del entrenamiento.

5.5.6 Glutation peroxidasa (GPX) de corazón.

Los resultados de nuestro estudio han mostrado una dramática y significativa disminución de la actividad enzimática de la GPX en el citoplasma del corazón, que fue del 96,8 % en comparación al valor más alto observada en el hígado y de un 94,9% en el músculo esquelético, observándose en este órgano el mayor daño por peroxidación lipídica en los tejidos del miocardio en los animales extenuados sin suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum.*

Al comparar los resultados de los distintos grupos experimentales, el grupo de ratas llevadas hasta la extenuación sin PD mostró una reducción estadísticamente significativa ($p<0,05$) en la actividad enzimática del corazón, con un 97,6 % menos de actividad, y por debajo de los niveles básales de los grupos sedentarios comparados con las ratas extenuadas con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum***.** Sin embargo, los efectos antioxidantes del *Phebodium decumanum* quedan de nuevo de manifiesto al observarse en las ratas extenuadas con PD valores de actividad de GPX similares a los obtenidos en ambos grupos de ratas sedentaria.

Diversos estudios han mostrado que en animales viejos sometidos a un ejercicio agudo la actividad de la GPX de citosol en el corazón disminuye,

sugiriéndose que esta capacidad antioxidante del corazón se debilita con la edad *(546)*. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio que muestran un agotamiento de la actividad enzimática de la GPX no pueden ser atribuidos a la edad de los animales. Así, los animales de nuestra experiencia eran jóvenes, pero la magnitud de la carga de trabajo físico parece haber sido la suficiente para deprimir la actividad de esta enzima en el corazón.

Se ha postulado que la capacidad antioxidante difiere en función a los niveles de estrógenos. Se ha observado que las ratas hembras tienen concentraciones de VE más altas en corazón e hígado. Sin embargo ellas observan una menor cantidad de glutation que las ratas macho *(578)*. Por ello, en nuestro estudio tampoco podríamos atribuir en parte estos resultados al género ya que todas las ratas utilizadas en nuestro estudio fueron machos jóvenes.

Quizá la diminuida concentración de GPX encontrada en los animales sin PD se explique por una prolongada hiperactividad de la defensa antioxidante para la metabolización del peroxido lipídico durante las primeras horas post-ejercicio. Esta diversidad en la actividad enzimática, como respuesta adaptativa al entrenamiento, puede depender por último del modelo específico de la expresión del gen para cada enzima, del umbral requerido para su inducción y sus interacciones *(474)*

A pesar de que algunos autores observaron que la presencia de la SOD y de la CAT del corazón e hígado disminuyen y que aumenta la GPX en las mitocondrias del corazón durante el ejercicio *(579)*. Nosotros evidenciamos una actividad disminuida de esta enzima al parecer, por el agresivo daño de las especies reactivas del oxígeno en la organización estructural y funcional de estos organelos, con la probable acumulación de calcio que podría limitar la fosforilación oxidativa en las mitocondrias del corazón, como una respuesta al programa de ejercicios extremos y crónicos.

Tal como ya hemos mencionado, una importante fuente prooxidante inducida por el ejercicio es la acumulación y oxidación de las catecolamina plasmáticas *(581)(580)(511)(574),* al igual que el aumento del consumo de oxígeno y el fenómeno de isquemia-reperfusión, que es un tanto mayor cuando más intenso es el ejercicio. Incluso se ha informado que el propio músculo activo puede entrar en un estado de hipoxia por insuficiente aporte energético *(580)(487)(484)(474)(472)* .

El fenómeno de reperfusión miocárdica tras un periodo de isquemia relativa puede desencadenar modificaciones importantes en la liberación de

enzimas intracelulares, incremento de calcio (Ca^{2+}) a nivel mitocondrial, reducción persistente de la contractibilidad y eventual necrosis miocárdica *(582)*

La caída del pH intracelular durante un ejercicio intenso de cierta duración en puede activar en el miocardio la bomba Na_2/H_2 (NHE), aumentando la concentración intracelular de Ca^{2+} a través de la bomba Na^+/Ca^{2+} (NCX). Además, el estrés oxidativo puede conducir a una sobrecarga de Ca^{2+}, que es otro potente estimulo para la producción de más radicales libres, provocando una retroalimentación positiva, además de activar el NHE durante la reperfusión al acidificarse el medio extracelular, lo cual conduce a un aumento todavía mayor de Ca^{2+} citosólico provocando la activación de las proteasas, entre la que se destaca la calpaina 1 que, atacando el aparato contráctil conducirá a la degradación de la troponina 1 (Tn1) y la consecuente disminución de la respuesta al Ca^{2+} de los míofilamentos.

También durante la isquemia reperfusión miocárdica se ha reportado disminución en la concentración intracelular de glutation reducido *(579). Leichtweis et al (545)* concluyeron en su estudio con ratas que ante un riguroso entrenamiento de natación de 6 horas diarias durante una semana y media, la función mitocondrial del corazón, se hace más susceptible tanto en vivo como *in vitro* al estrés oxidativo lo que puede estar relacionado a una reserva disminuida del glutation. También, *Leeuwenburgh et al (547)* en un estudio sobre los efectos del ejercicio agudo en la deficiencia de GSH en el corazón de ratones después de un ejercicio extenuante de natación observó una disminución significativa de la actividad de la GPX y de GSH en el miocardio asociado a una disminución significativa de glutation en el hígado, músculo esquelético y plasma.

El entrenamiento físico moderado ha demostrado ser capaz de aumentar los niveles de glutation en el corazón en el músculo y en las glándulas salivales. *Reddy et al (548)* observaron que, de acuerdo a sus resultados, el entrenamiento moderado es beneficioso en la disminución de la peroxidación lipídica y en el incremento de la actividad enzimática antioxidante específicamente en la glándula salival, así como en distintos órganos como el miocardio, con un efecto benéfico que varía de órgano a órgano.

Estos resultados concuerdan con lo comunicado por *Quintanilha (533)* quien observó un aumento en la actividad de la GPX en el corazón después de un ejercicio agudo y extenuante. En ciclistas profesionales se ha observado un aumento de los niveles básales de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX

en eritrocitos con respecto a sujetos sedentarios. Sin embargo, se comunicó además que la actividad de esta última enzima no fue modificada al finalizar el ejercicio *(471)*.

Sin embargo, a pesar de la dramática disminución de la GPX el grupo de animales ejercitados hasta el agotamiento crónico sin ingesta de PD (E), en nuestro estudio se deja en evidencia las altas concentraciones promedios de GPX obtenidas en el corazón en comparación al hígado y músculo esquelético encontrado en los animales sedentarios y extenuados con suplemento alimenticio de PD, cuyas diferencias no fueron significativas ($p<0,05$) entre estos tres grupos a pesar del estrés oxidativo que sufrieron las ratas del grupo de extenuación física con suplemento de alimenticio de PD.

Estos hallazgos dejan de manifiesto el efecto protector del *Phlebodium decumanum,* contribuyendo a la respuesta antioxidante miocárdica que se sabe que incluye a los antioxidantes directos como la vitamina VE, vitamina VA, vitamina VC y CoQ_9, así como la familia de enzimas SOD, CAT y GPX *(582)*.

Sin embargo, ante el menor daño oxidativo en el citoplasma y en las membranas mitocondriales en los órganos de los animales extenuados con suplemento alimenticio de PD, se podría decir que el *Phlebodium decumanum* tiene un efecto protector, dada la menor peroxidación lipídica de los grupos que lo tomaban. Sin embargo, desconocemos aún el mecanismo por el cual el *Phlebodium decumanum* ejercería este efecto protector ante el estrés oxidativo inducido por el sobreesfuerzo crónico y extenuante.

Punzón, C et al (461) en un estudio *in vitro* sobre la modulación del TNF y de sus receptores solubles por el *Phlebodium decumanum*, concluyeron que el PD actúa mediante un mecanismo que regula los niveles de TNF alfa a través de un incremento del IL-1Ra y sTNF-RII, que neutralizan la actividad de la IL-1 y del TNF respectivamente.

No obstante, en este estudio hemos tomado muestras de plasma sanguíneo en los cuatro grupos de ratas con y sin ejercicio para la detección de las citoquinas plasmáticas y de TNF alfa, y por razones metodológicas no pudimos encontrar niveles mínimos detectables para su análisis. De hecho, los modelos de experimentación animal más recomendados para estudiar la respuesta de las citoquinas son los de ratones. Pero, en nuestro caso, la inclusión en el protocolo

del ejercicio en cinta rodante hacía más recomendable el modelo con ratas que con estos animales.

El daño celular oxidativo, tanto en el miocardio como en los otros órganos estudiados en este trabajo, puede asociarse también a la liberación de distintas citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF) *(586)*. La interleuquinas son capaces de inducir la activación de la isoenzimas óxido nítrico (NO) sintetasa a nivel de neutrófilos y macrófagos, eventos asociados al proceso inflamatorio en varios órganos y a los que se atribuye el aumento de la producción de NO *(582)*. Las células fagocíticas liberan superóxido y otras moléculas citotóxicas como parte de la respuesta inflamatoria aguda en los focos de necrosis hística *(587)*. A través de un complejo mecanismo que parece involucrar a varias moléculas de señalización, los leucocitos activados alcanzan el intersticio donde las especies reactivas del oxígeno y enzimas líticas como la elastasa, colagenasa, catepsinas, e hialuronidasa conforman un importante complejo extracelular de daño miocárdico *(582)*.

Por último, en el corazón hemos encontrado el mayor daño oxidativo en comparación a los otros dos órganos por efecto del ejercicio extenuante, al observarse en este órgano a las 24 horas post ejercicio físico exhaustivo, una significativa concentración de hidroperóxidos seguida por la presencia de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.

Queda en evidencia además, una disminuida concentración de tocoferol en las membranas mitocondriales del miocardio y una agotada actividad enzimática de GPX citoplasmática, siendo quizá esta deprimida actividad encontrada proporcional a la intensidad y duración al daño oxidativo provocado. Los resultados observados en el grupo E+PD, como un aumento de las concentraciones de retinol y CoQ_9, en el tejido cardíaco están inducido por efecto del *Phlebodium decumanum,* necesitándose más estudios para conocer su mecanismo de acción en este sentido.

5.6 FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

5.6.1 Hígado

Por otra parte el estudio de la funcionalidad mitocondrial ante el estrés oxidativo en la membrana interna de la cadena de transporte de electrones (ETC) inducido por el ejercicio físico, fue otro de los objetivos de este trabajo, ya que,

la ETC en la mitocondria, el NADH-ubiquinona reductasa del complejo I y la ubiquinona-citocromo-c-reductasa del complejo III son sitios bien conocidos de generación de O_2.- y de H_2O_2 *(497)*. Este último por la transición desde dos electrones (NADH y $FADH_2$) a un electrón (ubiquinona) involucrando la semiubiquinona (QH.) La merma de este electrón en la molécula de oxígeno en este segmento de la ETC produce O_2.- *(497)***.** El O_2.- es rápidamente reducido a H_2O_2 en la mitocondria por la SOD, obteniéndose por último por la reacción de *Haber-Weiss* entre el O_2.- y H_2O_2 el radical OH. *(497)*.

En cuanto a la funcionalidad mitocondrial en el hígado, no se obtuvieron cambios estadísticamente significativos por el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico en la funcionalidad de las membranas en ninguno de los sistemas de citocromos $a+a_3$, b, $c+c_1$ de la cadena de transporte de electrones en las membranas mitocondriales del tejido hepático, a las 24 horas post-ejercicio.

Se observó en este órgano la menor cantidad de citocromos en comparación a los otros dos órganos, corazón y el músculo esquelético. Solamente en la comparación entre grupos hemos evidenciado un ligero aumento no significativo ($p<0,05$), de las concentraciones de estos constituyentes, en los grupos de animales que hacían ejercicio físico extenuante en comparación a los sedentarios. Este incremento fue ligeramente mayor en los grupos de animales extenuados con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum*.

La citoromo oxidasa es la enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial y el componente central para la transducción celular de energía, responsable, por tanto, de virtualmente de todo el consumo de oxígeno en mamífero *(456)*. Esta enzima está compuesta por 13 subunidades, tres de los cuales son transcritas y trasladadas dentro de la mitocondria, transcribiéndose el resto en el núcleo, después de lo cual se trasladan al citoplasma y se incorporan a la mitocondria antes de su ensamblaje *(458)*.

La citocromo c oxidasa depende en gran medida de la cardiolipina para poder desarrollar su actividad máxima *(540)*. *Yamaoka et al. (588)* observaron que la descomposición de los ácidos grasos de la cardiolipina mitocondrial en las ratas, así como la actividad de la citocromo c oxidasa, variaban drásticamente al modificar los lípidos de la dieta. Además de ello el consumo de oxígeno de la mitocondria de rata disminuye según lo hace la cantidad de cardiolipina del tipo 18:2 (n-16)/18:2(n-6).

La actividad de la citocromo oxidasa que hemos determinado en las mitocondrias hepáticas, evidenció ser la segunda actividad más alta de los tres órganos, no encontrándose cambios significativos en su actividad específica

como del turnover en dicha enzima en ninguno de los grupos de animales extenuados ni sedentarios.

Quiles J.L (562) estudió el efecto del ejercicio de baja intensidad en ratas con diferentes dietas experimentales girasol y aceite de oliva, observando un aumento en la actividad específica de esta enzima en el tejido hepático para ambas dietas experimentales, que fue significativo para los animales con dieta de aceite de oliva. Sin embargo, en ambas dietas experimentales no se observaron diferencias significativas en el contenido de citocromos $a+a_3$ al comparar las ratas sedentarias y las sometidas a un ejercicio crónico. De hecho, *Huerta et al (563),* en un trabajo en el que relacionaba grasa de la dieta y estrés oxidativo por administración de agentes xenobióticos, pusieron de manifiesto la existencia de otros factores que regulan la actividad de esta enzima, y que en concreto podría ser el aumento de la peroxidación lipídica.

Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de los biomarcadores de peroxidación lipídica encontrados en nuestro estudio, en los grupos de animales extenuados con o sin PD, no modificó significativamente las concentraciones de ninguno de los sistemas de citocromos $a+a_3$, b, $c+c_1$, siendo además las concentraciones más bajas de estos citocromos en comparación a los otros dos órganos estudiados, a pesar de que en estos tejidos se encontró la actividad específica, y de turnover más alta de la citocromo oxidasa. Quizás esta respuesta a los factores que regulan la actividad de esta enzima sea mas bien atribuible a las características del órgano estudiado.

El hígado parece ser el órgano que tiene mayor capacidad adaptativa para una recuperación rápida y eficiente, después de las agresiones sufridas por el estrés oxidativo inducido por el ejercicio extremo y crónico. Así, a pesar de la presencia de altas concentraciones de especies reactivas del oxígeno, no hemos observado cambios significativos en las concentraciones de los componentes de la ETC, como tampoco en la actividad de la citocromo oxidasa a las 24 horas post-ejercicio, no evidenciándose modificaciones significativas en la funcionalidad mitocondrial en el tejido hepático

5.6.2 Músculo esquelético

En el músculo hemos obtenido la segunda cantidad más alta de citocromos $a+a_3$, b y $c+c_1$ en comparación a la cantidad obtenida en el corazón e hígado. Estos resultados mostraron una inducción de estos constituyentes de la ETC por el ejercicio intenso, que estaban ligeramente más incrementado en aquellos animales que se alimentaban con *Phlebodium decumanum.*

Los resultados obtenidos en la cantidad de citocromos $a+a_3$ en nmol/mg de proteínas en el músculo esquelético fueron en un 37,1 % mayores que los obtenidos en el hígado.

En la comparación entre grupos, estos citocromos mostraron homogeneidad en los promedios de los cuatro grupos de ratas, siendo ligeramente mayor en los grupos de animales extenuados. Sin embargo, cuando estos fueron expresados en nmol/g de órgano fresco se observaron diferencias estadísticas entre los diferentes grupos de animales. La tasa más alta y significativa ($p<0,05$) de citocromos $a+a_3$ se obtuvo en el grupo E+PD en comparación a los dos grupos de ratas sedentarias, y al grupo de ratas extenuadas sin PD.

Asson- Batres et al., (589) han publicado que el oxígeno podría ser un fuerte inductor de la síntesis de citocromo $a+a_3$. Por ello, se sugiere que otro de los mecanismos de inducción enzimática podría ser el aumento de la producción de peróxidos a nivel de la membrana *(476)*. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan plenamente con esta última afirmación, ya que nosotros hemos obtenido una elevada peroxidación lipídica en las ratas extenuadas (E) sin evidenciar un aumento significativo en la cantidad de citocromos $a+a_3$. La mayor cantidad de citocromos $a+a_3$ llevó aparejada la menor peroxidación lipídica en los tejidos del músculo esquelético de las ratas extenuadas con PD, pudiendo ser esta respuesta debida a una inducción por parte del oxígeno y de otros factores que permitan asegurar la energía celular, cuyos efectos podrían estar relacionados con el *Phlebodium decumanum*

Aunque nuestro programa de extenuación física evaluaba los efectos crónicos del ejercicio en la funcionalidad mitocondrial, estos resultados son coincidentes con los hallados en otro estudio *(562)* con animales alimentados con diferentes tipos de dietas y que después de un ejercicio agudo observaron igualmente un fuerte incremento de los cuatro componentes de la ETC en la membrana muscular.

En este mismo estudio en ratas con dietas experimentales y ejercicio físico, también se encontró un incremento de citocromo c y complejo IV como respuesta al ejercicio crónico en los animales con ingesta de aceite de oliva. *(230)*. Estos resultados concuerdan con los nuestros en el aumento significativo ($p<0,05$) de las concentraciones de citocromos en nmol/g de órgano del complejo IV ($a+a_3$) en el grupo de ratas con ejercicio y PD (E+PD) comparadas con las ratas sedentarias sin PD (S).

La cantidad de citocromo b en el músculo esquelético fue mayor en un 44,2 % en comparación a la concentración más alta encontrada en el hígado. También hemos encontrado cambios estadísticamente significativos ($p<0,05$) en la aumentada concentración de citocromo b expresado tanto en nmol/mg de proteína como por gramo de órgano en el grupo E+PD comparado con ambos grupos de ratas sedentarias. Observándose homogeneidad entre los promedios de este constituyentes de la ETC entre los animales extenuados sin PD y los dos grupos de ratas sedentarias.

La concentración de citocromo b en el grupo de animales extenuados (E) fue un 44,2 % menor en comparación a las más altas obtenidas en el grupo de ratas extenuadas con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum*. Quizá esta menor concentración sea atribuible a un escape de electrones, probablemente a nivel de la ubiquinona-citocromo b, en la cadena mitocondrial de transporte de electrones con producción de anión superóxido *(587)*

La cantidad de citocromos $c+c_1$ fue un 50 % mayor en comparación a la encontrada en el tejido hepático, encontrándose también diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) ante la mayor inducción de estos citocromos por efecto del ejercicio físico en ambos grupos de ratas extenuadas, al expresarse los resultados tanto por nmol/mg de proteínas como por gramos de órgano, en comparación a los dos grupos de animales sedentarios. En ambos casos la cantidad mayor de citocromos $c+c_1$ fue obtenida en el grupo E+PD.

Estos resultados parecen poner de manifiesto nuevamente que la ingesta experimental de *Phlebodium decumanum,* mediante su efecto protector frente a la peroxidación lipídica en el tejido muscular, podría ayudar a proveer eficientemente después de un esfuerzo intenso y crónico la energía requerida al músculo esquelético a las 24 horas post-ejercicio, favoreciendo la mejora de la recuperación.

Sin embargo, la actividad específica de la enzima citrocromo oxidasa fue la más baja de los tres órganos estudiados. Su actividad fue en un 77,6 % menor que la encontrada en el tejido hepático, observándose una menor actividad de esta enzima en los dos grupos de animales extenuados en comparación a las ratas sedentarias.

También el turnover de esta enzima en el músculo esquelético fue el menor encontrado en comparación a los otros dos tejidos, así como en comparación a los animales sedentarios El valor más bajo fue hallado en el grupo de ratas

extenuadas (E) siendo estadísticamente inferior ($p<0,05$) al obtenido en los animales extenuados con ingesta suplementaria de PD.

Hemos encontrado en la citocromo oxidasa diferencias significativas ($p<0,05$) en su actividad en ambos grupos de ratas con ejercicio exhaustivo versus el grupo de ratas sedentarias con PD (S+PD), no siendo significativa la diferencia de un 27 % en la menor actividad obtenida en el grupo de animales extenuado (E), en comparación al grupo de ratas extenuadas y PD (E+PD).

La pérdida de actividad específica en los grupos que fueron extenuados físicamente no podría explicarse por un descenso del contenido de citocromos $a+a_3$ en el músculo, ya que éstos observaron un ligero aumento en comparación a los grupos de animales sedentarios. Estos resultados no coinciden con los encontrados en otro estudio *(562)* donde se ha observado un incremento de la actividad específica de este complejo enzimático después de un ejercicio agudo en animales de experimentación.

Por lo tanto, los animales crónicamente extenuados sin *Phlebodium decumanum,* al presentar una menor actividad específica de la citocromo oxidasa tendrían una menor opción de obtener energía para los mecanismos de reparación, por los altos niveles de peroxidación lipídica, fenómeno que podría participar en el posible daño a estructuras enzimáticas así como a la síntesis de las mismas *(575)* y finalmente a la falta de energía necesaria para el trabajo mecánico muscular.

Estos resultados evidencian que el músculo esquelético presenta un daño oxidativo inducido por el ejercicio físico extenuante, hasta tal punto que, su recuperación a las 24 horas post-ejercicio es más lenta, encontrándose como en los otros órganos, altas concentraciones de los biomarcadores de peroxidación lipídica, y una disminuida defensa antioxidante junto a modificaciones importantes en la cadena de transporte de electrones para proveer de energía.

5.6.3 Corazón

En el corazón se obtuvieron las mayores cantidades de citocromos en comparación al hígado y músculo esquelético. Las diferencias obtenidas ante la mayor cantidad de citocromos $a+a_3$ en este órgano en relación al hígado fueron de un 91,1 % y de un 85,9 % más en comparación al músculo esquelético.

Estas mitocondrias se caracterizan por poseer una actividad del citado complejo enzimático diez veces superior al hallado en mitocondrias de hígado y cuatro con respecto al músculo esquelético *(588),* pudiendo ser atribuidas las diferencias de trabajo, además de formas isoenzimáticas intertisulares como han descrito algunos autores *(589),* al mayor contenido de citocromos $a+a_3$ existente en la membrana interna mitocondrial cardiaca.

La respuesta adaptativa al estrés oxidativo inducido por el ejercicio extenuante en la funcionalidad de las mitocondrias del corazón en los diferentes grupos, fue similar a los obtenidos en el músculo esquelético y en alguna medida en el hígado. Los grupos de animales con ejercicio extenuante observaron las concentraciones más altas de los componentes de la cadena de transporte de electrones.

Hemos encontrado diferencias estadísticas ($p<0,05$) en nuestros resultados ante la mayor concentración de estos componentes al ser expresados en nmol/mg de proteína en el complejo IV ($a+a_3$) en el grupo E+PD, en comparación a los grupos de ratas con ejercicio sin PD(E) y a los dos grupos de animales sedentarios. No se observaron diferencias en sus concentraciones en estos últimos tres grupos de ratas, sedentarias y extenuadas sin PD.

Estos resultados nos indican que el suplemento alimenticio experimental de *Phlebodium decumanum* facilitaría en la membrana interna, durante esfuerzos intensos y crónicos, la fosforilación oxidativa, ya que ésta involucra reacciones químicas tales como el transporte de electrones y la síntesis de ATP, así como la generación del potencial electroquímico de protones transmembrana, para la obtención de energía *(590).*

También hemos encontrado un mayor aumento de citocromo b en el tejido cardíaco en un 51,5 % en comparación al músculo esquelético y en un 72,9 % más en comparación al hígado. En la comparación de los grupos, también hemos observado modificaciones significativas ($p<0,05$) en las concentraciones de citocromos b en las membranas del tejido miocárdico, al comparar el grupo de animales E+PD con los grupos de animales con ejercicio exhaustivo sin PD y los dos grupos de ratas sedentarias. La tasa más alta de citocromo b se obtuvo en el grupo de ratas extenuadas con suplemento alimenticio de *Phlebodium decumanum.*

El evidente efecto del *Phlebodium decumanum* hace que estos resultados sean importantes para la conservación de la energía, dado que estos complejos son una consecuencia de las propiedades termodinámicas de la cadena respiratoria o, en otros términos, de los potenciales redox de los transportadores de electrones.

Los resultados hallados en la cantidad de citocromos $c+c_1$ en las membranas mitocondriales del corazón también fueron mayores a las encontradas en los otros dos órganos, siendo sus diferencias un 77,7 % en relación al músculo esquelético y en un 88,9 % más que en el tejido hepático.

Las concentraciones más alta obtenida de citocromos $c+c_1$ fue encontradas en los animales extenuados con suplemento alimenticio de PD. Su diferencia fue estadísticamente significativa ($p<0,05$) en comparación a los grupos de ratas extenuadas sin PD y ambos grupos de animales sedentarios, quedando nuevamente de manifiesto en este estudio la mayor inducción de citocromos post-ejercicio por efecto del *Phlebodium decumanum*.

En estos resultados se aprecia la inducción de citocromos $c+c_1$ como respuesta adaptativa al ejercicio al evidenciarse una mayor cantidad ($p<0,05$) de estos componentes de la cadena de transporte de electrones en el grupo de animales extenuados (E) en comparación a los dos grupos de ratas sedentarias.

Por otra parte, la citocromo oxidasa en el complejo IV, que cataliza el último paso de la cadena de transporte electrónico siendo un constituyente importante para la transducción celular de energías *(559)* en la que el oxigeno molecular es el aceptor terminal, ha mostrado la mayor actividad enzimática en el tejido cardiaco, en un 95,4% en comparación al músculo esquelético y un 79,3 % más de actividad, que el obtenido en el hígado, encontrándose además en este tejido el segundo turnover más alto con una diferencia de un 48,5 % más en comparación al músculo esquelético. Estos resultados suponen una diferencia significativa ($p<0,05$) en el turnover entre los animales extenuados (E) y el mayor encontrado en el grupo de ratas extenuadas con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum.* La acitividad enzimática fue menor en ambos grupos de animales llevados hasta la extenuación en comparación a sus pares sedentarios. Además hemos encontrado diferencias significativas ($p<0,05$) en la mayor actividad de la citocromo oxidasa entre ambos grupos de animales sedentarios en comparación al grupo de animales agotados físicamente hasta la extenuación (E), mostrando una actividad homogénea entre las ratas S+PD y los animales extenuados y alimentados con *Phlebodium decumanum*.

Sin embargo, si bien esto es cierto, no fue significativa la diferencia encontrada entre ambos grupos de ratas extenuadas, aunque en el grupo E+PD se observó una actividad de un 31,2 % más que en los animales extenuados sin PD

En este órgano hemos evidenciado diferencias significativas en el aumento de los contenidos de citocromos $a+a_3$ en ambos grupos de animales extenuados.

Estos hallazgos concuerdan con lo señalado por *Quiles JL (562)*. Este autor atribuye sus resultados sobre la homogeneidad de la actividad específica encontrada en las mitocondrias del tejido cardíaco en ratas, con diferentes dietas y ejercicio, al aumento del contenido de citocromos $a+a_3$ en la membrana mitocondrial interna del corazón.

Por ultimo, y en atención a los resultados obtenidos en este órgano, se puede decir que el músculo miocárdico es uno de los órganos más agredido por el estrés oxidativo impuesto por el ejercicio extenuante y crónico, ante la incrementada presencia de las concentraciones de especies reactivas del oxigeno y a las importantes modificaciones de la actividad enzimática citoplasmática observadas en este estudio.

Sin embargo, nuestros resultados también nos indican que el corazón es un órgano cuya capacidad regenerativa es rápida y eficiente. Su protección se ha visto fortalecida por efecto del *Phlebodium decumanum* al encontrarse en la membrana mitocondrial y citoplasmática concentraciones optimas de antioxidantes y niveles de actividad enzimática que permiten al corazón la obtención de energía necesaria para seguir cumpliendo eficientemente sus funciones.

CONCLUSIÓN

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

A la luz de los resultados encontrados hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1.- El modelo utilizado en éste programa de extenuación física crónica permitió inducir un síndrome de sobreesfuerzo en los animales de experimentación, como lo demuestran el incremento del estrés oxidativo y la superación de las defensas antioxidantes, observadas a las 24 horas post-ejercicio, lo que clínicamente se manifestó como cambios en los pesos pondérales totales, de los órganos estudiados, de la ingesta de alimentos, y de la conducta de dichos animales, que se mostraron más agresivos.

2.- El aumento significativo de los biomarcadores de peroxidación lipídica en los tejidos hepáticos, cardiaco y del músculo esquelético en los animales extenuados sin suplementación de *Phlebodium decumanum (PD)* pueden estar relacionados con un eventual daño a nivel de las membranas mitocondriales, al aumentar la susceptibilidad de éstas a la peroxidación lipídica, comprometiéndose la funcionalidad mitocondrial para la producción de energía.

3.- Las menores concentraciones de especies reactivas del oxígeno, encontradas en los diferentes órganos de los animales extenuados con ingesta suplementaria de *Phlebodium decumanum (PD),* dejan en evidencia el efecto protector frente al estrés oxidativo de este inmunomodulador. Dicha aseveración la basamos en la evidencia de una menor producción de radicales libres, y en los cambios favorables observados en la actividad enzimática y las concentraciones de antioxidantes con una dosis mantenida de *Phlebodium decumanum.*

4.- El modelo de animales de experimentación elegido en este estudio no nos ha permitido establecer una relación entre los efectos protectores del *Phlebodium decumanum* sobre el daño oxidativo y los efectos reguladores de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 y TNF-α). Para el estudio de estas variables inmunológicas el modelo animal de ratas no fue el más adecuado para dicha determinación.

5.- Por todo lo anterior, es necesario ampliar los estudios sobre este suplemento nutricional para el mayor entendimiento de los mecanismos fisiológicos por los cuales actúa este inmunomodulador. Esto nos permitirá guiarnos en el desarrollo de estrategias apropiadas para mejorar la capacidad celular antioxidantes y la disfunción inmune en sujetos sometidos a grandes volúmenes de trabajo físico.

6.- En la convicción de lo antes mencionado, se acepta la hipótesis experimental (H1) rechazándose la hipótesis nula (H0), al evidenciarse en los resultados de este trabajo un menor incremento de las especies reactivas del oxígeno, en aquellos animales extenuados físicamente y alimentados con suplemento de *Phlebodium decumanum.* Sin embargo, la hipótesis experimental (H2) es omitida por no obtenerse los valores mínimos detectable para su determinación.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1)Lewin, R. (1980) Evolutionary theory under fire. *Science*, **210**, 883-884.

2)Vidal, G. (1981) Oldest eukaryotic cell. *Sc Am*, **250**, 806-807.

3)Weiner, J.S. (1971) Man`s Natural History Weidenfeld and Nicolsen, *Sc Am*, **240**, 56-58.

4) Washbirn, S.L (1978) The evolution of man, *Sc Am*, **239**, 146-147.

5)Ingelmark, B.E. Kholn, R. (1948) A study of variation in the thickness of articular cartilage in association with rest and periodical load, *Uppsala Lakareforening Forhadlinger*, **53**, 61-68.

6)Paffenbarger, R.S. Jr.Hyde, R.T. & Wing, A.L. (1990): Physical activity and physical fitness as determinants of health and longevity. *Champaign, IL* **43**, 33-48

7)Noble, B.J. Borg, G.A.V., Cafarelli, E. Robertson, R.J. & Pandolf, K.B.(1997): Symposium on recent advances in the estudy and clinical use of perceived exertion. *Medicine and Science,* **14**, 376-411.

8)Macintyre, DL. Sorichter, S. Mair, J. Berg, A. Mc Kenzie, DC. (2001): Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *EurJ App Phyisiol,* **84**, 180-186

9)Akova, B. Surmen -Gur, E. Gur, H. Dirican, M. Sarandole, E. Kucukoglus, S. (2001): Exercise induced oxidative stress and muscle performance in healthy women role of vitamin E. *J Appl Physiol*, **84,** 141-147.

10)Bejma, J. Ramirez, P. Ji, LL. (2000) Free radical and oxidative stress with ageing and exercise:differential effects in the myocardium and liver.*Acta Physiol Scand,* **169**, 343-351.

11)Salminen, A. Vihko, V. (1983): Endurance training reduces the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation in vitro. *Acta Physiol Scand, **117**,* 109-113.

12)Ji, L.L. (1993): Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc*, **25**, 225-231.

13)Vuori, I. Oja P, Cavill. Coumans B (2000): La Actividad Física para la Salud. *Boletín de la Federación Española de Medicina del Deporte*. Diciembre **6,** 1-6

14)Aspray, TJ. Mugusi, F. Rashid, S. Whiting, D. Eduards, R. Alberti, KG. Unwing, NC. (2000): Rural and urban differences in diabetes prevalence in Tanzania: the role of obesity, physical inactivity and urban living. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **94,** 637-644.

15)Brooks, CM. (1987): Leisure time physical activity assment of American adults through analysis of time diaries collected in 1981. *Am J Public Health ,* 77, 455-470.

16)Sato, Y.(2000): Diabetes and life-style: role of physical exercise for primary prevention. *Br J Nutr,* **84,** 187-190.

17)Woo, J. (2000): Relations hips among diet, physical activity and other lifestyle factors and debilitating diseases in the elderly. *Eur J Clin Nutr,* **54**, 43-47.

18)Mundal, R. Kjeldsen, SE. Sandvik, L. Erikssen, J. (1996): Exercise blood pressure predicts mortality from myocardial infartion hypertension. *Am J Med*,**27,** 324-329.

19)Lim, P.O. Rana, B.S. Struthers, A.D Mc Donald, T.M. (2001): Exercise blood pressure correlates with the maximun heart rate corrected Q T interval in hypertens. *Eur J Clin Nutr,***15**, 164-172.

20)Cooper, K.H. Pollock, M.I et al. (1976): Physical fitness levels vs. Selected coronary risk factors. *Jama,* **236**, 166-169.

21)Paolone, A.M. Lewis, R.R. et al. (1976): Results of two years of exercise training in middle-aged men. *Phys Sportsmed*, **4,** 64-69.

22)De Vries, H.A. (1979): Physiological effects of an exercise training regimen upon men aged 52 to 82. *J Gerontol***, 25,** 325-336.

23)Pierce, M. Harding, D. Ridout, D. Keen, H. Bradley, C. (2001): Risk and prevention of type 2 diabetes: offepring's views. *Br J Gen Pract*, **51,** 194-199.

24)Dela, F. Vaag, A.A. (2000): Physical training in the treatment of type 2 diabetes. *Ugeskr Laeger,* **162**, 2185-2189.

25)Sato, Y. (2000): Effects of physical cativities on the type 2 diabetes. *Nippon Rinsho***, 58**, 385-390.

26)Mc Tierman, A. (2000): Associations between energy balance and body mass index and risk of breast carcinoma in women from diverse racial and ethnic backgrounds in the US. *Cancer*, **88,** 1248-1255.

27)Rissanen, A. Fogelholm, M. (1999): Physical activity in the prevention and treatment of other morbid conditions and impairments associated with obesity current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exercise*, **31,** 635-645.

28)Boden-Albala, B. Sacco, RL. (2000): Lifestyle factors and stroke risk; exercise, alcohol, diet, smoking, drug use, and stress. *Curr Atheroscle Rep***, 2,** 160:166.

29)Leon, AS. Casal, D. Jacobs, D. (1996): Effects of 2000 kcal per week of walking and stair climbing on physical fitness and risk factors for coronary heart disease. *J Cardiopulm Rehabil,* **16**, 183:192.

30)Halar, E.M.(1999): Management of stroke risk factors during the process of rehabilitation Secondary strokeprevention. Phys Med Rehabil Clin Nam, **10**, 839-850.

31)Arakawa, K. (1999): Exercise a measure to lower blood pressure and reduce other risks. *Clin Exp Hypertens***, 21**,797-803.

32)Thune, I. (2000): Assessments of physical activity and cancer risk. *Eur J Cancer Prev,* **9**, 387-393.

33)Rockhill, B. Willet, W.C. Manson, J.E. (2001): Physical activity and mortality a propective study among women. Am J Public Health, **91**, 578-583.

34)Morris, J.N. Heady, J.A. Raffle, P.A.B. Roberts, C.G. Parks, J.W. (1953): Coronary heart-disease and phisical activity of work. *Lancet, II,* **34**, 1111-1120.

35)He, J. Ogden, LG. Bazzano, LA. Vupputuri, S. Loria, C. Welton, PK. (2001): Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med ,* **161,** 996-1002

36)Chen, YT. Vacarino, V. Willians, CS. Butler, J. Berkman, LF. Krumholz, HM. (1999): Risk factors for hecert failure in the elderly a prospective community-based study. *Am J Med,* **106,** 605-612.

37)Bedinghaus, J. Leshan, L. Diehr, S. (2001): Coronary artery disease prevention: what's different for women? *Am Farm Physician*, **63,**393-400.

38)Tanji, J.L. (2000): The benefits of ecercise for women. *Clin Sports Med***, 19,** 175-185.

39)Ehsani, A.A., (1995): Martin, W.H.,et al. Cardiac effects of prolonged and intense exercise training in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*, **210**, 246-254.

40)Wannamethee, SG. Shaper, AG. (2001): Physical activity in the prevention of cardiovascular disease an epidemiological perspectiv. *Sports Med***, 31**,101-114.

41)Redwood, D.R. Rosing, D.R. et al.(1992): Circulation end symptomatic effectsof physical training in patients with coronary artery disease and angina pectoris.*Circulation. N Engl J Med***, 286**, 959-965.

42)Mitchell, J.H. (1995): Exercise training in the treatmentof coronary heart disease.*Adv Intern Med*, **20,** 249-273.

43)Graf, C. Bjarnason-Wehrens, B. Rost, R. (2001): Preventing coronary heart disease by physical activity. How much exerciseis necessary *MMW Fortschr Med,* **143,** 28-30.

44)Detry, J.R. Rousseau, M. et al. (1991): Increased arteriovenous oxygen different after physical training in coronary artery disease. *Circulation,* **58,** 109-118.

45)Janion, M. Bakowski, D. (2000): Change of lifestyle as a relevant therapy after myocardial infartion. *Przegl Lek*, **57**, 469-473.

46)Litchfield R.L. Kerber B.E. et al. (1992): Normal exercise capacity in patients with severe left ventricular dysfunction. *Circulation,* **66,** 129-134.

47)Wilson J.R. Ferraro, N. (1993): Exercise tolerance in patients with chronic left heart failure: relation to oxygen transport and ventilatory abnormalities. *Am J Cardiol,* **51,** 52-60.

48)Higginbotham M.B. Morris, K.C. et al (1993): Determinamts of variable exercise performance among patients with severe left ventricular dysfunction. *Circulation ,* **61**, 955-959.

49)Lakka, TA. Laukkanen, JA. Rauramaa, R. Salonen, R. (2001): Cardiorespiratory fitness and progression of carotid atherosclerosis in middle-aged men. *Ann Intern Med,* **134,** 12-20.

50)Benge, W. Litchfield, R.L.(1990): Exercise capacity in patients with severe left ventricular dysfunction. *Circulation,* **61**, 955-959.

51)Francis, K. (1996): Physical activity in the prevention of cardiovascular disease. *Phys Ther*, **76,** 456-458.

52)Birrer, R.B. (1997): Physical activity in the prevention and management of cardiovascular disease. *World Rev Nutr Diet***, 28**, 191-209.

53)Gardner, M.M. Buchner, D.M., Roberts, M.C. Campbell, A.J. (2001): Practical implementation of an exercise-based falls prevention programme. *Age Ageing,* **30,** 77-83.

54)Laurin, D. Verreault, R. Lindsay, J. Mac Pherson, K. Rockwad, K. (2001): Physical activity and risk of cognitive imparirment and dementia in elderly person. *Arch Neurol*, **58,** 498-504.

55)Hickson, R.C et al.(1992): Reduced training duration effects on aerobic power, endurance, and cardiac growth. *J Appl. Physiol,* **53,** 225-228

56)Holloszy, J.O. Coyle, E.F. (1994): Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl. Physiol*, **56,** 831-835.

57)Kiessling, K. (1991): Effects of physical trining on ultrastructural features in human skeletal muscle. Nnueva York, *Plenum Press*.

58)Pattengale, P.K. Holloszy, J.O. (1987): Augmentation of skeletal muscle myoglobin by programs of treadmill running. *Am. J Physiol*, **36,**783-787.

59)Donovan, C.M. Brooks, G.A. (1993): Endurance training affects lactate clearance, not lactateproduction. *Am. J. Physiol***, 244**, 83-89.

60)Gollnick, P. Hermansen, L. (1983): Biochemical adaptation to exercise: anaerobic metabolism. Nueva York. *Academic Press*.

61)Thorstensson, A. (1992): Effect of strength training on enzyme activities and fiber characteristics in hunan skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand*, **96**, 392-395.

62)Gollnick, O. (1983): Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained men. *J. Appl. Physiol,* **33,** 312-315.

63)Larsen, A. Aarsland, T. Kristiansen, M. Haugland, A. (2001): Assessing the effect of exercise training men with heart failure. Comparison of maximal, submaximal and endurance exercise protocols. *Eur Heart J,* **22,** 684-692.

64)Boghossian, S. Alliot, J. (2000): A moderate swimmingexercise regularly perfomed throughout the life induces age and sex-related modification in adaptive macronutrients choice. *Mech Ageing Dev,* **120**, 95-109.

65)Terramot, S. (1998): Theorical basisfor usefulness in COPD patients. *Chest, **114,** 942-943.*

66)American College of Sports Medicine. (1999): Guidlines for exercise testing and prescription. Filadelfia: *Lea & Febiger*.

67)American College of Sports Medicine.(2000): Guidlines for exercise testing and prescription. Filadelfia: *Lea & Febiger.*

68)Howell, J. (1996): The 1996 surgeon generals Reporton Physival Activity and Health. *Nurse Pract Forum*, **7,** 104-107.

69)Scheuer, J. (1992): Effects of physical training on myocardial vascularity and perfusion. *Circulation,* **66,** 491-495.

70)Froelicker, V.F. (1986): The hemodynamic effects of physical conditioning in healthy young mean and middle-aged individuals,and in coronary heart disease. *Academic Press, New York*, **67;** 63-77.

71)Alvárez, M. (1997): Cordova A. Fatiga Muscular en el rendimiento Deportivo. *Editorial Síntesis, S.A*, 186-187.

72)Straus, S.E. Komarof, A.l. Wedner, H.J. (1994): Chronic fatigue syndrome: Point and Counterpoint. *The J. Infect. Dis,* **170,** 1-6.

73)Cordova, A. (1997): Fatiga Muscular en el rendimiento Deportivo. *Editorial Síntesis, S.A*, 336-337.

74)De Teresa, C. (1999): Modificación del perfil de riesgo cardiovascular mediante el ejercicio físico. *Revista de Educación Médica Continuada en Riesgo cardiovascular***, 8,** 8-11.

75) Rotne, H. (2000): Very late reaction to allergen-especific inmunotherapy caused by physical exercise. *Allergy,* **55**, 194-150.

76)Pedersen, B.K. Bruunsgaard, H. Heckel, F. (1997): Exercise-induce inmunomodulation Possible role of neuroendocrine and metabolic factors. Int J *Sports Med,* **18,** 2-7

77)Venkatraman, J.T. Pendergast, D. (1998): Effects of level of dietary fat intake and endurance exercise on plasma cytokines in runners. *Med Sci Sports Exerc,* **30,** 1198-1204.

78)Koning, D. Gratthwohl, D. Weinstock, C. Northoff, H. Berg, A.(2000): Upper respiratory tract infection in athetes influence of lifestyl, type of sport, training effort, and inmunostimulant intake. *Int J Sport Med***, 21**, 294-301.

79)Smith, L.L. Anwar, A. Fragen, M. Rananto, C. Johnson R. Holbert, D.(2000): Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise.*Eur J. Appl. Physiol*, **82,** 61-67.

80)Macintyre, DL. Sorichter, S. Mair, J. Berg, A. Mc Kenzie, DC. (2001): Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *EurJ App Phyisiol,* **84,** 180-186

81)Rohde, T. MacLean, D.A. Richter, E.A. Kiens, B. Pedersen, B.K. (1997): Prolonged submaximal eccentric exercise is associated with increased levels of plasma IL-6. *Am J.Physiol***, 273**, 85-91.

82)Muller Werdan, U. Engelmann, H. (1998): Cardiodepression by tumor necrosis factor-alpha. *Eur Cytokines Netw***, 9,** 689-691.

83)Mazzeo, R.S. (1994): The influence of exercise and aging on immune function. *Med Sci Sports Exerc,* **51**, 2255-62.

84)Reighlin, S. (1993): Neuroendocrine-immune interactions. *New Engl J Med,* **329,** 1246-53.

85)Schneiderman, N. Klimas, N. Fletcher, M.A. (1994): Exercise and psychoneuroimmunology. *Med Sci Sports Exerc*, **26**, 182-90

86)Somani, S.M. Arroyo, C.M. (1995): Exercise training generates ascorbate free radical in rat heart. *Indian J Physiol Pharmacol*, **38**, 323-329.

87)Ji, L.L. (1993): Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc*, **25,** 225-231.

88)Sen, C.K. Rankinen, T. (1994): Vaisanen S., Rauramaa R. Oxidative stress after human exercise. *J Appl Physiol*, **76,** 2570-2577.

89)Reid, MB. (2001): Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc***, 33**, 371-376.

90)Sánchez, M.L. Martín T. Mateos, F. García-Salgado, M.J. Pérez, Arellano, J.L.(1993): Radicales libres de oxígeno y células del sistema mononuclear fagocítico. *Inflamación*, **4,** 166-175.

91)MüllerF, Rollag, H. Froland, S.S. (1990): Reduced oxidative burst responses in monocytes and monocytes-derived macrophages from infected subjects. Clin. *Exp.Immunol,* **82,** 10-15.

92)Freeman, B.A. Crapo, J.D. (1992): Biology of disease. *Laboratory Investigation*, **47,** 412-420.

93)Sjodin, B. Hellsten Westing, Y. Apple, F.S. (1990): Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med*, **10**, 236-254.

94)Ji, LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. (1999): *Proc Soc Exp Biol Med***, 222,** 283-282

95)Astrand P.O. Rodhal K. (1986): Textbook of work physiology. New York. *McGraw Hill*, 432-454.

96)Keul J. Doll E. Koppler D. (1972): Energy metabolism of human muscle. *Basel S. Karger*, 324-326.

97)Kanter, M.M. Nolte, L.A. Holloszy, J.O. (1993): Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest postexercise. *J Appl Physiol,* **74**, 965-969.

98)Oh-ishi, S. Kizaki, T. Ookawara, T. Sakurai, T. Izawa, T. Nagata, N. Ohno, H.(1997): Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise -induced oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med,* **156,** 1579-1585.

99)Downey, J.M. (1990): Free radical and their involvement during longterm myocardial ischemia and reperfusion. *Anny Rev Physiol*, **52,** 487-504.

100)Leaf, DA. Kleinman, MT. Hamilton, M. Deitrick, RW. (1999): The exercise-induced oxidative stress paradox the effects of physical exercise training. *AmJ Med Sci,* **317,** 295-300.

101)Singh, V.N. (1992): A current perspective of nutrition and exercise. *J Nutr*, **122**, 760-765.

102)Turrens, J. (1999): Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. *Rev. Antioxidantes*, **34,** 234-237.

103)Jaeschke, H. Bautista, A.P. Spolarics, Z. Spitzer, J.J. (1995): Superoxide generation by neutrophils and kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukocyte Biol,* **52,** 377-382.

104)Córdoba, A. Alvarez-Mon, M. (1999): El sistema inmune: Importancia de los inmunomoduladores en la recuperación del deportista. *Archivos de Medicina del deporte***,** **70,** 155-156.

105)Palombo, J.D. Blackburn G.L. Forse, R.A. (1991): Endothelial cell factors and response to injury. *Surgery*, **173**, 505-519.

106)Koo Akomatsu H. Tao, G. Inoue, M. Guth, P.H. Kaplowitz, N. (1995): Contribution of no -reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion:evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology,* **15,** 507-514.

107) Arters, B.H. (1998): Effect of resistence exercise on free radical production. *Med Sci Sports Exerc*, **30,** 67:72

108)Piñero, A. Ramirez, P. Chávez Cartaya, R. Marín, J.M. Canteras, M. Parrilla, P. (1998): Evaluación de la microcirculación hapática y la lesión por reperfusión en un modelo experimental de hepatectomía parcial. *Cir Esp,* **64,** 412-415.

109)Díaz, J. Serrano, E. Acosta, F. Carbonell, L. (1998): Lipoperoxides kit evaluated for measuring lipoperoxides in biological samples: reference intervals for human plasma. *Clinical Biochemistry*, **31**, 277-279.

110)Peralta, C. Hotter, G. Closa, D. Gelpi, E. Bulbena, O. Roselló-Catafau, J. (1997): Protective effects of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*, **25,** 934-937.

111)Risby, T.H. Maley, W. Scott, R.P.W. Bulkley, G.B. Kazui, M. Sehnert, S.S.(1994): Evidence for free radical-mediated lipid peroxidation at reperfusion of human orthotopic liver transplants. *Surgery,* **115,** 94-101.

112)Díez, J. Fortuño, M.A. González, A., Ravassa S. (1999): Apoptosis y enfermedades cardiovasculares. Unidad de Fisiopatología Vascular. Facultad de Medicina. *Universidad de Navarra***, 47-**48

113)Sies, H.(1993): Strategies of antioxidants defense. *Eur J Biochem*, **215,** 213-219

114)Bejma, J. Ramirez, P. Ji, LL. (2000) Free radical and oxidative stress with ageing and exercise:differential effects in the myocardium and liver.*Acta Physiol Scand,* **169,** 343-351.

115)Pereira, B. Costa Rosa, L.F. Safi, D.A. (1994): Medeiros M.H., Curi R., Bechara E.J.: Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoidorgans of sedentary and exercise-trained rats. *Physiol Behav,* **56,** 1095-1099.

116)Beyer, R.E. (1992): An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell Biol*, **70,** 390-403.

117)Groussard, C. Morel, I. Chevanne, M. Monnier, M. Cillard, J. Delamarche, A. (2000): Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol*, 89, 169-175.

118)Strauss, S.E. Komarof, A.L. Wedner, H.J. (1994): Chronic fatigue syndrome: Point and counterpoint. *The J Infect. Dis,* **170,** 1-6.

119)Reighlin, S. (1993): Neuroendocrine-immune interactions. *New Engl J Med,* **329,** 1246-1253.

120)Huerta, J.R (2000): Informe de Experto Phlebodium Decumanum.Instituto de *Nutrición y Tegnología de los Alimentos*. Universidad de Granada.

121)Sigal, L.H. Ron, Y. (1994): Immunology and inflamation. Basic mechanisms and clinical consequences. New York. *McGraw-Hill.*

122)Weinroth, SE. (1995): Wasting syndrome in AID: Pathophysiologic mechanisms and therapeutic approaches. Infect. *Agents Dis*, **4,** 76-78.

123)Kelly, P. (1996): Sistemic immune activation as a potential determinant of wasting in Zambians with HIV-related diarrhoes. *Q j M,* **89,** 831-836.

124)Elliott, P. (1998): Cancer cachexia: a preclinical and clinical review. Drug and *Market Development*, **9,** 26-28.

125)Kesavan, S. (1997): Current Opinion in Cardiology. *Cardiology,* **12,** 218-220.

126)De Teresa, C. (2000): Rizoma enriquecido de Phlebodium Decumanum en la fatiga y el desgaste muscular. *Informe de Experto*. Consejería de Turismo y Deportes.

127)Pedersen, B.K. (2000): Special feature for the olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines.*Immunol Cell Biol*, **78**, 532-535.

128)Reid, MB. (2001): Nitric oxide, reactive oxygen species and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc*, **33,** 371-376.

129)Alessio, HM.(1993): Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, **25**, 218-224.

130)Warren, JA. (1992): Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. *J Appl. Physiol*, **72,** 2168-2175.

131)Jenkins, RR. Friedland, R. Howald, H.(1984): The relationship of oxygen consumption to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. *Int J Sports Med*, **4,** 11-14.

132)Ji, LL. Fu, R. Mitchell, EW. (1992): Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol*, **73,**1854-1859.

133)Jenkins, RR. Goldfardb, A. (1993) : Introduction : oxidant stress, aging.and exercise. *Med Sci Sports Exercise*, **25,** 210-212.

134)Zerba, E. Komorowski, TE. Faulkner, JA. (1990) : Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice. *Am J Physiol*, **258,** 429:435.

135)Quiles, JL. Rodríguez, J. Mañas, M. Cassinello, M. Battino, M. Ochoa, JJ. Mataix, J. (1996): Funcionalidad mitocondrial en hígado y músculo de ratas alimentadas con aceite de oliva virgen o aceite de girasol y sometidas a un estrés oxidativo inducido por ejercicio físico. *Archivos de Medicina del Deporte***, 52**, 93-98.

136)Davies, KJA. Quintanilha, AT. Brooks, GA. Packer, L. (1982): Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Comm*, **107**, 1189-1205.

137)Buil, MA. Sarti, MªA. Ferrero, JA. (1995): Radicales libres y estrés oxidativo en el ejercicio físico. *Archivos de Medicina del Deporte,* **49**, 347-352.

138)Reznick, A. Witt, EH. Matsumoto, M. Packer, L. (1992): Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochem Biophys Res Comm*, **189,** 801-806.

139)Meydany, M. Evans, WJ. Handelman, G. Biddle, L. Fielding, RA. Meydani, SN. Burril, J. Fiatarone, MA. Blumberg, JB. Cannon, JG. (1993): Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am Physiol*, **264**, 992-998.

140)Li, JX. Tong, CW. Xu, DQ. Chan, KM. (1999): Changer im membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats. *Eur Jappl Physiol Occup Physiol***, 80**, 113-117.

141)Anuradha, CV. Balakrishnana, SD. (1998): Effect of trainning on lipid peroxidation thiol status and antioxidant enzimes in tissues of rats. *Indian J Phyisiol Pharmacol*,**42,** 64-70.

142)Faff, J. Frankiewicz-Jozko, A. (1997): Effect of ubiquinone on exercise induced lipid peroxidation in rats tissues. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **75,** 413-417.

143)Gohil, K. Fothfuss, L. Lang, J. Packer, L. (1987) : Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content. *J Appl Physiol***, 63,** 1638-1641.

144)Witt, EH. (1992): Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J Nutr*, **122,** 766-773.

145)Packer, L. (1997): Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci,* **15,** 353-363.

146)Shigenaga, MK. Gimeno CJ. Ames, BN. (1989): Urinary 8-hydroxy-deoxiguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86,** 9697-9701.

147)Alessio, HM. (1993): Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc***, 25**, 218-224.

148)Inoue, T. Mu, Z. Sumikawa, K. Adachi, K. Okochi, T. (1993): Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxide-oxygua-nosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jap J Cancer Res*, **84,** 720-725.

149)Sen, CK. Rankinen, T. Vaisanen, S. Rauramaa, R. (1994): Oxidative stress after human exercise: effect after N-acetylcysteine supplementation. *J Appl Physiol*,**76,** 2570-2577.

150)Hartmann, A. Niess, AM. Grunert-Fuchs, M. Poch, B. Speit, G. (1995): Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutation Res*, **346,** 195-202.

151)Viña, J. Servera, E. Asensi, M. (1996): Exercise cause blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease. Prevention by oxygen therapy. *Journal of Applied Physiology,* **81**, 2199-2202.

152)Ji, LL. Katz, A. Fu, R. Griffiths, M. Spencer, M. (1993): Blood glutathion status during exercise: effect of carbohydrate supplementation. *J Appl Physiol*, **74,** 788-792.

153)Leeuwenburg, C. Fiebig, R. Chandwaney, R. Ji, LL. (1994): Aging and exercise trainig in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol,* **267,** 439-445.

154)Smoly, J. Kuylenstierna, B. Ernster, L. (1970): Topological and functional organization of the mitochondrion. *Proc Natl Acad Sci USA*, **66,** 125-131

155)Tzagoloff, A. (1982): Evolution of mitochondrial studies. In Mitochondrias.*Plenum Press, New York*, **45**,1-14

156)Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Watson, J. (1989): The mitochondrion. In Molecular Biology of the Cell, *Garland Publishing, New York*,32, 342-356.

157)Yaffe, M. Schatz, G (1984): The future of mitochondrial research. *Trends Biochem. Sci*, **45,** 9-179.

158)Babcock, GT. Wickstrom, M (1992): Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*, **38,** 356-301.

159)Ernster, L. (1984): Bionergetics. *Amterdam: Elsevier*.

160)Hatefi Y. (1993): ATP syntesis in mitochondria. *Eur J Biochem Pud Med -index for Medline,* **218**, 759-767

161)Calhoun, MW. Thomas, JW. Gennis, RB. (1994): The cytocrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochem Sci.* **48,** 19-325.

162)Trumpower, BL. Gennis, RB. (1994): Energy transduction by cytochrome complexes im mitochondrial and bacterial respiration:the enzimology of coupling electron tranfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu Rev Biochem,* 63, *675-716*

163)Boyer, PD. (1989): A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J,* **3,** 2164-2169

164)Pedersen, PL. Carafoli, E. (1987): Ion motive ATPases .I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem*, **56,** 12-186.

165)Shoffer, JM. Wallace, DC. (1994): Oxidative phosphorylation diseases and mitochondrial DNA mutations. *Annu, Rev. Nutr*, **14,** 535- 539.

166)Wikstrom, M. Krab, K. Saraste, M. (1981): Proton-translocating cytochrome complexes. *Annu. Rev. Biochem*, **50,** 623-628.

167)Hanson, RW. (1989) :The role of ATP in metabolism. *Biochem. Educ*, **17,**86-92.

168)Kornberg, HL. (1987) : Tricarboxylic acid cycles. *Bio Essays*,**7,** 236- 242.

169)McCormack, JG. Denton, RM. (1986): Ca2+ as second messenger within mitochondria. *Trend Biochem. Sci*, **11,** 268-276.

170)Shoffner, JM. Wallace, DC. (1994): Oxidative phosphorylation diseases and mitochondrial DNA mutations. *Annu. Rev. Nutr*, **14,** 535-546.

171)Behal, RH. Buxton, DB. Robertson, JG. Olson, MS. (1993): Regularation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Annu. Rev. Nutr,* **13**, 497-499

172)Reed, LJ. Hackert, ML. (1990): Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyl transferases . *J.Biol. Chem*, **265,** 8971- 8977.

173)Patel, MS. Harris, RA. (1995): Mammalian alfa-keto acid dehydrogenase complexes:gene regulation and genetic defects. *FASEB J,* **9,** 1164-1170.

174)Saraste, M. (1999): Oxidative phosphorilation at the fin de siecle. *Science,***283,** 1488-1493.

175)Casey, R. (1984): Membrane reconstitution of energy-conserving enzimes of oxidative phosphorilation. *Biochim Biophys Acta,* **56,** 474-493.

176)Stoppani, A. Boveris, A. (1983): La mitocondria y la estructura de la cadena de transporte de electrones. *En Bioquímica General*. El Ateneo. Buenos Aires, 453:473.

177)Slater, E. (1967): Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorilation. *Meth Enzimol,***10,** 48-57.

178)Estabrook, R. (1967): Mitochondrial respiration control and the polarographic measurements of ADP: O ratios. *Meth Enzimol,***10,** 41-47.

179)Mitchell, P. (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, **191**,144-148.

180)Turrens, JF. (1997): Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *BiosciRep,***17,** 3-8.

181)Beckman, JS. Carson, M. Smitch, CD. Koppenol, WH. (1993): ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature,* **354,** 432-437.

182)Alvarez, S et al. (1999): The mitochondria. *Published in antioxidants and life*, **45,** 456-459

183)Pryor, WA. (1986): Oxy-radicals and related species: their formation, life times, and reactions. *Ann Rev Physiol*, **48,** 657- 662.

184)Freeman, BA. White, CR. Gutierrez, H. Paler-Martinez, A. Tarpey, MM. Rubbo, H. (1995): Oxygen radical-nitric oxidereactions in vascular diseases. *Adv Pharmacol*, **34**, 45-69.

185)Michaelis, L. (1946): Fundamentals of oxidation and reduction; in Green DE:Currents in Biochemical Research. *New York Interscience*, **54,** 207-227.

186)Puntarulo, S. Galleano, M. Sanchez, RA. Boveris, A. (1991): Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochem Biopys Acta Gen Subj*,**1074**, 277-283.

187)Ballester, M. (1995): Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Med Clin,* **107,** 509-510.

188)Crapo, JD. (1986): Morphological changes in pulmonary oxygen toxicity. *Ann Rev.Physiol,* **48,** 721-731.

189)Chance, B. Sies, H. Boveris, A. (1979): Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, **59**, 527-605.

190)Ernter, L. Dallner, G. (1995): Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*, **1271**, 195-204.

191)Shirasugi, N. Wakabayashi, G. Shimazu, M. Shito, M. Kawachi, S. Kitajima, M. (1997): Interleukin-1 receptor blockade attenuates oxigen-derived free radical production and microcirculatory disturbances in ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transplant-Proc*, **129,** 371-372.

192)Ota, T. Hirai, R. Urakami, A. Soga, H. Nawa, S. Shimizu, N. (1997): Endothelin-1 levels in portal venous blood in relation to hepatic tissue microcirculation disturbance and hepatic cell injury after ischemia/reperfusion. *Surgery Today*, **27,** 313-320.

193)Prasad K., Kalra J., Chaudhary AK., Pharm M., Debnath D. (1990): Effect of polymorphonuclear leukocyt-derived oxygen free radicals and hypochlorous acid on cardiac function and some biochemical parameters. *Am Heart J*, **3,** 358-360.

194)Jaeschke H., Farhood A., Bautista AP., Spolarics Z., Spitzer JJ. (1993): Complement activates Kupffer cell and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol*, **264**, 801- 810.

195)Dinauer, MC. Orkin, S. (1992): Chronic granulomatous disease. *Annu Rev Med*, **43,** 117-124.

196)Jaeschke, H. (1996): Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol*, **25**, 774-778.

197)Clavien, PA. Morgan, GR. Sanabria, JR. Petrunka, C. Levy, GA. Robert, P. (1991): Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation,* **52 ,** 412-415..

198)Adams DH, Wang, LF. Burnett, D. Stockley, RA. Neuberger, JM. (1990): Neutrophil activation an important cause of tissue damage during liver allograft rejection. *Transplantation*, **50 ,** 86-89.

199)Beckman, JS. Carson, M. Smith, CD. Koppenol, WH. (1993): ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature,* **58** , 364-365.

200)Denicola, A. Rubbo, H. Rodriguez, D. Radi, R. (1993): Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to trypanosoma cruzi. *Arch Biochem Biophys*, **56 ,** 304:279.

201)Marletta, MA. (1993): Nitric oxide a synthase structure and mechanism. J *BiolChem*, **268**, 8410-8418.

202)Wu, W. (1993): Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Exp Neurol*, **120,** 153-158.

203)Assreuy, J. Cunha, FQ. Liew, FY. (1993): Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br.J.Pharmacol*, **108,** 833-846.

204)Ghafourifar, P. Richter, C. (1997): Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEDS Lett,* **418,** 291-297.

205)Lowenstein. CJ. Dinerman, JL. Snyder, SH. (1994): Nitric oxide a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, **120,** 227-229.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

206)Sakaguchi, AA. (1999): Depto. Internal Medicine, Keio Univ. Tokyo. *Free Radical Biology and Medicine,* **27,** 781-787.

207)Bredt, DS. Snyder, SH. (1994): Nitric oxide a physiologic messenger molecule. *Annu Rev. Biochem*, **63,** 175-179.

208)Koo, A. Komatsu, H. Tao, G. Inoue, M. Guth, PH. Kaplowitz, N. (1999): Contribution of no -reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion : evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology*, **15,** 507-511.

209)Díaz, J. Serrano, E. Acosta, F. Carbonell, L. (1998): Lipoperoxides kit evaluated for measuring lipoperoxides in biological samples: reference intervals for human plasma. *Clinical Biochemistry*, **31,** 277-279.

210)Eddy, LJ. Stewart, JR. Jone, HP. (1987): Free radical-producing enzyme, xanthine oxidase is undetectable in human heart. *Am J Physiol*, **253,** 709-711.

211)Mc Cord, JM. (1987): Oxygen-derived radicals : a link between reperfusion injury and inflammation. *Federation Proc*, **46,** 2402-2403.

212)Shibuya, H. Ohkohchi, N. Seya, K. Satomi, S. (1997): Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ASE activity in the perfused rat liver cold preservation . *Transpl Proc*, **29,** 1328-1330.

213)Ferreira, R. (1994): Que son los radicales libres. *Antioxidantes y calidad de vida*, **6**, 8-10.

214)Singal, PK. Iliskovic, N. Li, T. (1997): Adriamycin cardiomyopathy:pathophisiology and prevention. *FASEB. J,* **11,** 931-936.

215)Shapira, J. Gotfried, M. Lishner, M. (1998): Reduced cardiotoxity of doxorubicin by a 6 hour infusion regimen. *Cancer*, **65**, 870-875.

216)Smith, LL. (1986): The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Ann Rev Physiol*, **48**, 681-686.

217)Leadon, SA. Stampfer, MR. Bartley, J. (1988): Production of oxidative DNA damage during the metabólico activation of benzo-alfa pyrene in human mammary epithelial cell correlates withcell killing. *Proc Nattl Acad Sci USA*, **85**, 4365:4366.

218)Rajagopalan, S. Politi, PM. Sinha, BK. Myers, CE. (1988): Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart:Implications for cardiotoxicity.*Cancer Res*, **48**, 4766-4768.

219)Adelman, R. Saul. RL. Ames, BN. (1988): Oxidative damage to DNA: Relation to species metabólico rate and lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 2706-2713.

220)Imlay, JA. Linn, S. (1988): DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**, 1302-1307.

221)Lean, MA. Norozzi, M. Kelly, I. Burns, J. Talwar, D. Sattar, M. Crozier, A. (1999): Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, **48**, 176-181.

222)Aruoma, O. Halliwel, B. Dizdaroglu, M. (1989): Iron ion-dependent modification modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem*, **264**, 1302- 1307.

223)Dizdaroglu, M. (1991): Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biol Med*,**10**, 225-228.

224)Isabelle, V. Prévost, C. Spotheim-Maurizot, M. Sabattier, R. Charlier, M. (1995): Radiation-induced damages in single and double stranded DNA. *Int J Radiat Biol*, **67**, 169-173.

225)Morgan-Hughes, JA. Sweeney, MG. Cooper, JM. Hammans, SR. Brockington, M. Shapira, AHV. Harding, AE. Clark, JB. 1995): Mitochondrial DNA: correlation of genotype to Phenotype. *Biochemica et Biophysica Acta*, **89**, 1271:135.

226)Adachi, K. Fujiura, Y. Mayumi, F. Nozuhara, A. Sugiu, Y. Sakanashi, T. Hidaka, T. Toshima, H. (1993): A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, **195**, 945-949.

227)Ames, BN. Shigenada, MK. Hagen, TM. (1995): Mitochondrial decay in aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, **88**, 1271:165.

228)Menissier, J. (1997): Requiriment of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cell. *Proc Natl AcadSci.USA*, **94**, 7303:7304.

229)Richter, C. Gogvadze, V. Laffranchi, R. Schlapbach, R. Schweizer, M. Suter, M. Walter, P. Yaffee, M. (1995): Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **89**, 1271:67.

230)Muller-Hocker, J. (1990): *J Neurol Sci*,**100**, 14-18.

231)Yen, TC. Chen, YS. King, KL. Yeh, SH. Wei, YH. (1989): Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 994-996.

232)Chance, B. Sies, H. Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, **59**, 527-528.

233)Schoffner, JM. Wallace, DC. (1990): *Adv Hum Genet*, **19**, 267-268.

234)Wallace, DC. Shoffner, JM. Trounce, Y. Brown, MD. Ballinger, SW. Corral-Debrinski, M. Horton, T. Jum, AS. Lott, MT. (1995): Mitochondrial DNA mutation in human degenerative diseases and aging. *Biochemica et Biophysica Acta*, **271**, 141-142.

235)Southorn, PA. Powis, G. (1998): Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc*, **140**, 531-536.

236)White, BC. Krause, GS. Aust, SD. Eyster, GE. (1995): Postishemic tissue injury by iron-mediated free radical lipid peroxidation . *Ann Emergency Med,* **14**, 804-807.

237)Dormandy, TL. Wickens, DG. (1997): The experimental and clinical pathology of diene conjugation. *Chem Phys Lipids*, **45**, 353-558.

238)Gtteridge, JMC. (1989): Iron and Oxygen: A biologically damaging mixture. Acta *Ped Scand,* **361**, 78- 80.

239)Cetinkale, O. Belce, A. Konukoglu, D. Senyuva, C. Gumustas, MK. Tas, T. (1997): Evaluation of lipid peroxidation and total antioxidant status in plasma of rats following thermal injury. *Burns,* **23**,114-118.

240)Tribble, DL. Yee, T. Jones, DP. (1987): The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology*, **7**, 377-379.

241)Llesuy, S. Milei, J. Picone, V. Gonzalez Flecha, B. Beigelman, R. Boveris, A. (1995): Effect of vitamin A and E on ischemia reperfusion damage in rabbit heart. *Moll Cell Biochem*, **12**, 45-51.

242)Schauenstein, E. Esterbauer, H. Zollner, H. (1977): Aldehydes in biological Systems. *London :Pion,* **1**, 205-210.

243)Romaschin, AD. Rebeyka, I. Wilson, GJ. Mickle, AG. (1987): Conjugated dienes in ischemic and reperfuesed myocardium: an in vivo chemical signature of oxygen free radical mediated injury. *J Mol Cell Cardiol*, **19**, 289-293.

244)Cardenas, E. Boveris, A. Chance, B. (1980): Low-level chemiluminescence of hydroperoxide supplemented citochhrome c . *Biochem J,* **187**, 131-137.

245)Boveris, A. Llesuy, S. Fraga, CG. (1985): Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. *Free Radic Biol Med,* **1**:131-138.

246)Milei, J. Boveris, A. Llesuy, S. (1986): Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rbbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J*, **111**, 95-99.

247)Ferreira, R. Milei, J. Llesuy, S. (1998): Antioxidant action of vitamins A and E in patients submitted to coronary artery bypass surgery. *Vasc Surg*, **25**, 191-196.

248)Muggli, R. (1993): Free radical tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. *Richelieu Press. London .UK*, **189**, 204-207.

249)Weiss, SJ. (1989): Tissue destruction by neutrophils: *N. Engl.J. Med*, **320**,365-376.

250)García, JJ. Reiter, RJ. Guerrero, JM. Escames, G. Yu, BP. Oh, CS. (1997): Melatonina prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS*, **408**, 297-300.

251)Cross, CE. Halliwell, B. Borisch, ET. Pryor, WA. Ames, BN. (1995): Oxygen radicals and human disease. *Ann.Intern.Med*, **110**, 526-544.

252)Hand, WL. King-Thompson, NL. (1996): Effects of erythrocyte ingestion on macrophage antibacterial funtion . *Infect.Immun,* **85**, 917-923.

253)Schiller, HJ. Reilly, PM. Bulklry, GB. (1993): Antioxidant therapy. *Crit Care Med*, **21**, 92-10.

254)Grace, PA. (1994): Ischaemia-reperfusion injury. *J Surg,* **81**, 637-648.

255)Kirchner, RE. Fantini, GA. (1994): Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury . *J Am Coll Surg,* **308**, 70-77.

256)Osaki, N. Nakamura, M. Teraoka, S. Ota, K. (1997): Ebselen, a novel antioxidant compound protects the rats liver from ischemia-reperfusion injury. *Tranpl. Int,* **10**, 96-110.

257)Cho, WH. Kim, DG. Murase, N. Mischinger, HJ. Todo, S. Starzl, TE. (1996): Comparison of superoxide dismutase allopurinol coenzyme Q10 and glutathione for the preservation of warm ischemic injury. *Transplantatio*, **62**, 353-354.

258)Marubayashi, S. Dohi, K. Occhi, K. Kawasaki, T. (1987): Protective effects of free radical scavenger and antioxidant administration on ischemic liver cell injury. *Transpl Proc*, **19**, 1327-1328.

259)De Cavanagh, EM. Inserra, F. Ferder, L. Romano, L. Ercole, L. Fraga, CG. (1995): Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. *FEBS Lett,* **361**, 22-24.

260)Nunes, FA. Kumar, C. Chance, B. Bras, CA. (1995): Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia-reperfusion. *Dig Dis Sci,* **40**, 1045-1053.

261)Palombo, JD. Blackburn, GL. Forse, RA. (1991): Endothelial cell factors and respose to injury. *Surgery,* **173**, 505-519.

162)Kobayashi, K. Nonami, T. Kurokawa, T. Sugyyama, S. Ozawa, T. Takagi, H. (1996): Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. J Surg Res, **51**, 240-244.

263)Jolly, SR. Kane, WJ. Bailie, C. (1994): Canine miocardial reperfusion injury its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Cir Res,* **84**, 277-279.

264)Chiu, C. Wu, TW. (1997): Effect of catalase on hepatic ischemia. *Transpl Proc*, **62**, 1077-1081

265)Hiraishi, H. Terano, A. Ota, SI. (1998): Oxygen metabolite induced cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol*, **376**, 40- 48.

266)Miligan, SA. Hoeffel, JM. Goldstein, IM. Flick, MR. (1988): Effects of catalase on endotoxin-induced acute lung injury in unanestheetized sheep. *Am Rev Respir Dis*, **137**, 420-428.

267)Kono, Y. Fridovich, G. (1994): Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem.* **357**, 5751-5754.

268)Klein, AS. Joh, JW. Rangan, U. Wang, D. Bulkley GB. (1996): Allopurinol discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities. *Free Radic Biol Med*, **21**, 713-717.

269)Khaper, N. Singal, PK. (1997): Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats. *Jacc,* **29**, 243-248.

270)Harbrecht, BG. Di Silvio, M. Chough, V. Kim, YM. Simmons, RL. Billiar, TR. (1997): Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes. *Surgery,* **225**, 76-87.

271)Paduraru, I, Ciocoiu, M. Petrescu, E. Saramet, A. Colev, V. Paduraru, O. (1997): The effect of the combination of vitamin E and C on the oxidative stress parameters in physical exercise. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, **101**, 103-108.

272)Bauer, C. Walcher, F. Kalweit, U. Larsen, R. Marzi, I. (1997): Role of oxide in the regulation of the hepatic microcirculación in vivo. *J Hepatol,* **27**, 1089-1095.

273)Djordjevic VC., Pavlovic D., Pejovic M., Cvetkovic T., Lecic N., Deljanin-Ilic M: Changes of lipoid peroxides and antioxidative factors levels in blood of patients treated with ACE inhibitors.Clin Nephrol.**1997**;47:25:34.

274)Sokol, RL. McKim, JM. Goff, MC. Ruyle, SZ. Devereaux, MW. Han, D. (1998): Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology*, **114**, 164-168.

275)Prasad, K. Kalra, J. Chaudhary, AK. Pharm, M. Debnath, D. (1990): Effect of polymorphonuclear leukocyt-derived oxygen free radicals and hypochlorus acid on cardiac function and some biochemical parameters. *Am Heart J*, **3**, 538-550.

276)Jaeschke, H. Farhood, A. Bautista, AP. Spolarics, Z. Spitzer, JJ, (1993): Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol*, **264**, 801-809.

277)Olthoff, KM. Wasef, E. Seu, P. Imagawa, DK. Freischlag, JA. Hart, J. (1991): PGE1 reduces injury in hepatic allografts following preservation. *J Surg Res*, **50**, 595-601.

278)Galli, C. Simopoulos, AP. Tremoli, E. (1994): Fatty acids and lipids:biological aspects. World Rev. *Nutr Diet. Basel Karger*, **75**, 155-161.

279)Medyani, NS. (1995): Vitamin E enhancement of T cell-mediated function in healthy elderly:mechanisms of action. *Nutrition Reviews*, **53**, 52-58.

280)HOPE. (2000): Vitamin supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *New Engl J Med*, **342**, 154-160.

281)Stephens; NG. Parsons, AM. Schofield, PM. (1996): Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (Chaos).*Lancet*, **347**, 781-786.

282)Gissi. (1999): Dietary supplementation with n-3 polyunsatured fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the Gissi-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet.Aug.***7**;354 (9177),447-455.

283)Sano, M. Christopher, Ernesto. MS., Thomas, RG. (1997): A controlled trial of selegiline, alpha tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N Engl J Med,* **336**, 1216:1222.

284)Kugiyama, K. (1999): Kumamoto University School. Japan. *JACC,* **33**, 1512-1518.

285)Ricciarelli, R. (2000): Institute of Biochemistry and Molecular Biology. Berna, Suiza. *Circulation,* **56**, 82:87.

286)Boaz, M. (2000) : Tel Aviv University. *Lancet,* **356**, 1213-1218.

287)Dayuan, LI. (2000): University of Florida and VA Medical Center Gainsville. Florida. J Cardiovasc. *Pharmacol,* **36**, 297-301.

288)Devaraj, S. (1999): University of Texas, Dallas, Texas. Arterioscler Thromb Vasc *Biol,* **19**, 1125-1133.

289)Losonczy, KG. Harris, TB. Havlik, RJ. (1996): Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of allcause and coronary heart disease mortallity in older persons: the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. *Am J Clin Nutr*, **64**, 190-196.

300)Hodis, HN. Mack, WJ. LaBree, L. (1995): Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA,* **27**, 1849- 1852.

301)Berliner, JA. Navab. M. Fogelman, AM. Frank, JS. Demer, LL. Edwards, PA. Watson, AD. Lusis, AJ. (1995): Atherosclersis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*, **91**, 2488-2492.

302)Kushi, LH. Folsom, AR. Prineas, RJ. Mink, PJ. Wu, Y. Bostick, RM. (1996): Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in posmenopausal women. *New engl J Med,* **334**, 1156-1161.

303)Gokce, N. Keaney, JF. Frei, B. (1999): Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasamotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, **99**, 32-34.

304)Kaufmann, PA et al. (2000): Vitamin C and microcirculation coronary.Imperial College School of Medicine. *Circulation,* **102**, 1233-1238.

305)Ting, HH. Timimi. FK. Haley, EA. (1997): Vitamn C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation,* **95**, 2617-2622.

306)Horning, B. Arakawa, N. Kohler, C. (1998): Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation,* **97**, 363-368.

307)Levine, GN. Frei, B. Koulouris, SP. (1996): Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation,* **93**, 1107-1113.

308)Galley, HF. Thornton. J. Howdle, PD. (1997): Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clincal Science*, **92**, 361-365.

309)Duffy, SJ. Gokce, N. Holbrook, M. (1999): Treatment of hypertension with ascorbic acid. *Lancet,* **56**, 324-328.

310)Fotherby, MD. Williams, JC. Forster, LA. (2000): Effects of vitamin C on ambulatory blood pressure and plasma lipids in older persons. *J Hypertension*, **18**, 411-415.

311)Hennekens, CH. Buring, JE. Manson, JE. (1996): Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *New Engl J Med*, **334**, 1145-1149.

312)Omenn, G. Goodman, G. Thronquist, MD. (1996): Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New Engl J Med*, **334**, 1150-1155.

313)Heinonen, OP. (1994): The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New Engl J Med*, **330**, 1029-1035.

314)Blot, WJ. (1993): Nutrition intervention trials in Lixian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidense, and disease specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst,* **85**, 1483-1492.

315)Gey, KF. (1991): Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality form ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr,* **53**, 3265-3269.

316)Salom, MG. Ramirez, P. Carbonell, LF. López, Conesa, E. Cartagena, J. Quesada, T. (1998): Protective effect of N-acetyl -cysteine on the renal failure induced by inferior vena cava occlusion. *Transplantation*, **65**, 1315-1321.

317)Clavien, PA. Morgan, GR. Sanabria, JR. Petrunka, C. Levy, GA. Robert, P. (1991): Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation,* **52**, 412-417.

318)Steib, A. Freys, G. Collin, F. Launoy, A. Mark, G. Boudjema, K. (1998): Does N-acetylcysteine improve hemodynamics and graft function in liver transplantation. *Liver Transpl Surg,* **4**, 152-157.

319)Weber, C. Jakobsen, TS. (1994): Effect of dietary coenzyme Q10 as an antioxidant in human plasma. *Mol. Aspect Med*, **15**, 97-102.

320)Ernster, L. Dallner, G. (1995): Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta,* **1271**, 195-204.

321)Mohr, D. Bowry, VW. (1992): Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, **1126**, 247-254.

322)Alleva, R. Tomasetti, M. (1995): The role of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfraction. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**, 9388-9391.

323)Forsmark-Amdree, P. Ernster, L (1994): Evidence for for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation .*Mol Asp med*, **15**, 73-81.

324)Aberg, EL. Aberg, F. (1992): Distribution and redox states of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch Biochem Biophys*, **295**, 230-234.

325)Frei, B. Kim, MC. Ames, BN. (1990): Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 4879-4883.

326)Mitchel, P. (1975): Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain : protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lettt,* **56**, 1-6.

327)Yokoyama, H. Lingle, DM. Crestanello, JA. (1996): Coenzyme Q10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. *Surgery*, **120,** 189-196.

328)Matasushima, T. Sueda, T. (1992): Protection by coenzyme Q10 of canine myocardial reperfusion injury after preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **103**, 945-951.

329)Nayler, WG. (1980): The use of coenzyme Q10 to protect ischemic heart muscle. Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q10. Yamamura Y., Folkers K. *Elsevier/North Holland Press; NY*, **2**, 409-424.

330)Whitman, GJ. Niibory, K. Yokoyama, H. (1997): The mechanism of coenzime Q10 as a therapy for myocardial ischemia reperfusion injury. *Mol Asp Med***, 54**, 195-203.

331)Atar, D. Mortensen, SA. Flachs, H. (1993): Coenzyme Q10 protects ischemic myocardium in an open chest swine model. *Clin Invest*, **71**, 103-111.

332)Birnbaum, Y. Hale, SL. Kloner, RA. (1996): The effect of coenzyme Q10 on infarct size in a rabbit model of ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*, **32**, 861-868.

333)Judy, WV. Stogsdill, WW. (1993): Myocardial preservation by therapy with coenzime Q10 during heart surgery. *Clin Investig*, **71**, 155-161.

334)Chello, M. Mastroroberto, P. (1994): Protection by coenzyme Q10 from myocardial reperfusion injury during coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg,* **58**, 1427-1432.

335)Reid, MB. (2001): Nitric oxide, reactive oxygen species and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc*, **33**, 371-376.

336)Alessio, HM.(1993): Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc***, 25**, 218-224.

337)Warren, JA. (1992): Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. *J Appl. Physiol***, 72**, 2168-2175.

338)Jenkins, RR. Friedland, R. Howald, H.(1984): The relationship of oxygen consumption to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. *Int J Sports Med*, **4**, 11-14.

339)Ji, LL. Fu, R. Mitchell, EW. (1992): Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol*, **73**,1854-1859.

340)Jenkins, RR. Goldfardb, A. (1993) : Introduction : oxidant stress, aging.and exercise. *Med Sci Sports Exercise*, **25**, 210-212.

341)Zerba, E. Komorowski, TE. Faulkner, JA. (1990) : Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice. *Am J Physiol*, **258**, 429:435.

342)Quiles, JL. Rodríguez, J. Mañas, M. Cassinello, M. Battino, M. Ochoa, JJ. Mataix, J. (1996): Funcionalidad mitocondrial en hígado y músculo de ratas alimentadas con aceite de oliva virgen o aceite de girasol y sometidas a un estrés oxidativo inducido por ejercicio físico. *Archivos de Medicina del Deporte*, **52,** 93-98.

343)Davies, KJA. Quintanilha, AT. Brooks, GA. Packer, L. (1982): Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Comm*, **107**, 1189-1205.

344)Buil, MA. Sarti, MªA. Ferrero, JA. (1995): Radicales libres y estrés oxidativo en el ejercicio físico. *Archivos de Medicina del Deporte,* **49**, 347-352.

345)Reznick, A. Witt, EH. Matsumoto, M. Packer, L. (1992): Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochem Biophys Res Comm*, **189**, 801-806.

346)Meydany, M. Evans, WJ. Handelman, G. Biddle, L. Fielding, RA. Meydani, SN. Burril, J. Fiatarone, MA. Blumberg, JB. Cannon, JG. (1993): Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am Physiol*, **264**, 992-998.

347)Li, JX. Tong, CW. Xu, DQ. Chan, KM. (1999): Changer im membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats. *Eur Jappl Physiol Occup Physiol,* **80**, 113-117.

348)Anuradha, CV. Balakrishnana, SD. (1998): Effect of trainning on lipid peroxidation thiol status and antioxidant enzimes in tissues of rats. *Indian J Phyisiol Pharmacol*,**42**, 64-70.

349)Faff, J. Frankiewicz-Jozko, A. (1997): Effect of ubiquinone on exercise induced lipid peroxidation in rats tissues. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **75**, 413-417.

(350)Gohil, K. Fothfuss, L. Lang, J. Packer, L. (1987) : Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content. *J Appl Physiol***, 63**, 1638-1641.

351)Witt, EH. (1992): Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J Nutr*, **122**, 766-773.

352)Packer, L. (1997): Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci***, 15**, 353-363.

353)Shigenaga, MK. Gimeno CJ. Ames, BN. (1989): Urinary 8-hydroxy-deoxiguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 9697-9701.

354)Alessio, HM. (1993): Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, **25,** 218-224.

355)Inoue, T. Mu, Z. Sumikawa, K. Adachi, K. Okochi, T. (1993): Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxide-oxygua-nosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jap J Cancer Res*, **84**, 720-725.

356)Sen, CK. Rankinen, T. Vaisanen, S. Rauramaa, R. (1994): Oxidative stress after human exercise: effect after N-acetylcysteine supplementation. *J Appl Physiol*,**76**, 2570-2577.

357)Hartmann, A. Niess, AM. Grunert-Fuchs, M. Poch, B. Speit, G. (1995): Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutation Res*, **346**, 195-202.

358)Viña, J. Servera, E. Asensi, M. (1996): Exercise cause blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease. Prevention by oxygen therapy. *Journal of Applied Physiology,* **81**, 2199-2202.

(359)Ji, LL. Katz, A. Fu, R. Griffiths, M. Spencer, M. (1993): Blood glutathion status during exercise: effect of carbohydrate supplementation. *J Appl Physiol*, **74**, 788-792.

360)Leeuwenburg, C. Fiebig, R. Chandwaney, R. Ji, LL. (1994): Aging and exercise trainig in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol,* **267**, 439-445.

361)Reid, MB. (2001): Redox modulation of skeletal muscle contraction waht we know and what we don't. *J Appl Physiol***, 90**, 724-731.

362)Sacheck, JM. Decken, EA. Clarkson, PM. (2000): The effect of diet on vitamin E intake and oxidative stress in response to acute exercise in female athetes. *Eur J Appl Physiol*. **83**, 40-46.

363)Akova, B. Surmen -Gur, E. Gur, H. Dirican, M. Sarandole, E. Kucukoglus, S. (2001): Exercise induced oxidative stress and muscle performance in healthy women role of vitamin E. *J Appl Physiol*, **84**, 141-147.

(364)Dykens, JA. Wiseman, RW. Hardin, CD (1996): Preservation of phosphagen kinase function during transient hypoxia via enzyme abundance or resistance to oxidative induction. *J Comp Physiol*, **166**, 359-368.

365)Evans, WJ. (2000): Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr,* **72**, 647-652

366)Stahl, W. Sies, H. (1997) : Antioxidant defense vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes,* **46**, 14-18.

367)Shephard, RJ. (1998): Inmune changer induced by exercise in adverse enviroment. *Can J Physiol Pharmacol*, **76**, 539-546.

368)Natea, MG. Drenth, JP. De Bont, N. Hijmans, A. Keuter, M. Dharmana, E. Demacker, PN. Vander, Meer, JW.(1996): A semi quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method for measurement of MRNA for TNF-alpha and IL-1 beta in whole blood cultures its aplication in typhoid fever and eccentric exercise. *Cytokine,* **8**, 739-744.

369)Sastre, J. Asensi, M. Gasco, E. Pallardo, FV. Ferrero, JA. Furukawa, T. Vina, T. (1992): Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol*, **263**, 992-995.

370)Oastenbrug, GS. Mensink, RP. Hardeman, MR. De Vries, T. Brouns, F. Hornstra, G. (1997) : Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol***. 83,** 746-752.

371)Wong, BK. Chan, HC, Corcoran, GB. (1986): Selective effects of N-acetylcysteine stereoisomers on hepatic glutathione and plasma sulfate in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **86** , 421-429.

372)Khawli, FA. Reid, MB. (1994): N-acetylcysteine depresses contractile function and inhibits fatigue of diaphragm in vitro. J Appl Physiol, **77,** 317-324.

373)Childs, A. Jacobs, C. Kaminski, T. Halliwell, B. Leeuwenburgh, C.(2001): Supplementation with vitamin C and N- acetylcysteine increases oxidative stress in human after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med,* **31**, 745-753.

374)Kaikkonen, J. Kosonen, L. Nyyssonen, 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 an muscular damage: a placebo-controlled double-blind study in marathon runners. *Free Radic Res*, **29**, 85-92.

375)Porter, DA. Costill, DL. Zachwieja, JJ. Krzeminski, K. Fink, WJ. Wagner, E. Folkers, K. (1995): The effect of oral coenzyme Q10 on the exercise tolerance of middle-aged, untrained men. *Int J Sports Med*, **16,** 421-427.

376)Braun, B. Clarkson, BM. Freedson, PS. Kohl, RL.(1991): Effects of coenzyme Q10 supplementation on exercise performance, VO2 max, and lipid peroxidation in trained cyclists. *Int J Sport Nutr***, 4**, 353-365.

377)Alleva, R. Tomasetti, M. Battino, M. Curatola, G. Littarru, GP. Folkers, K. (1995): The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**, 9388-9391.

378)Simon, HB.(1987): Exercise and Infection. *Physician and Sports Medicine***, 15,** 135-141

379)Horstmann, DM. (1985): Acute poliomyelitis: relation of physical activity at the time of onset to the course of disease. *JAMA*, **142**, 236-241.

380)Weinstein, L. (1973): Poliomyelitis-A persistent problem. *N Engl J Med*, **288**, 370-373.

381)Levinson, SO. Milzer, A. : Effect of fatigue, chilling, and mechanical trauma on resistance to experimental poliomyeliti. *Am J Hygiene,* **42**, 204-213.

(382)Rosenbaum, HE. Harford, CG. (1953): Effect of fatigue on susceptibility of mice to poliomyelitis. *Am J Hygiene*, **83**, 678-681.

383)Good, RA. Fernandez, G. (1981): Enhancement of inmunologic function and resistance to tumor growth in Balb/c mice by exercise. *Fed Proc,* **40**, 1040-145.

384)Cannon, JG. Kluger, MJ. (1984) : Exercise enhances survival rate in mice infected with Salmonella typhimurium. *Proc Soc Exp Biol Med*, **175**, 518-521.

385)Rusch, HP. Kline, BE. (1944): The effect of exercise on the growth of a mouse tumor. *Cancer Res,* **4**, 116-118.

386)Friman, G. Ilback, NG. (1982): The effects of strenuous exercise on infwedtion with Francisella tularensis in rats. *J Infect Dis*, **145**, 706-714.

387)Riley, V. (1981): Psychoneuroendocrine influences on inmunocompetences and neoplasia. *Science,* **212**, 1100-1109.

388)Douglas, DJ. Hanson, PG. (1978): Upper respiratory infections in the conditioned athlete. *Med Sci Sports Exer*,**10**, 55-58.

389)Tomasi, TB. Trudeau, FB. (1982): Immune parameters in athletes before and after strenuous exercise. *J Clin Immunol***, 2**, 173-178.

390)Tharp, GD. Barnes, MW. (1990): Reduction of saliva immunoglobulin levels by swimm training. *Eur J Aplied Physiology and occupational physiology***, 60,** 61-64.

391)Keast, D. Cameron, K. Morton, AR. (1988): Exercise and the Immune Response *Sports Medicine,* **5**, 248-267.

(392)Mc Kinnon, LI. (1992): Exercise and Immunology. *Human Kinetick Publishers*. Champaign Illinois, **87**, 123-125.

393)Simon, HB.(1995): Immune Mechamisms and Infectious Diseases in Exercise and Sports. *Exercise in Human Immune Function*, **95**,116-120.

394)Pedersen, Bk. Bruunsgaard, H. Heckel, F. (1997): Exercise-induce immunomodulation.Possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. *Int J Sports Med,* **18**, 2-7.

395)Natelson, BH. Zhou, X. Ottenweller, JE. Bergen, MT. Sisto, SA. Drastal, S. Tapp, WN. Gause, WL. (1996): Effect of acute exhausting exercise on cytokine gene expression in men. *Int J Sports Med***, 17**, 299-302.

396)Pizza, FX. Mitchell, JB. Davis, BH. Starling, RD. Holtz, RW. Bigelow, N. (1995): Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leucocyte and lymphocyte subsets. *Med Sci Sport Exerc*, **27**, 363-370.

397)Rohde, T. Mac Lean, DA. Richter, EA. Kiens, B. Pedersen, BK. (1997): Prolonged Submaximal eccentric exercise is associated with increased levels of plasma IL-6. *Am J Physiol,* **273**, 85-91.

398)Córdova, A. Alvarez-Mon, M. (1999): Importancia de los inmunomoduladores en la recuperación del deportista. *Archivos de Medicina del deporte*, **70**, 155-164.

399)Espersen, GT. Elbaek, A. Ernst, E. Toft, E. Kaalund, S. Jersild, C. Grunnet, N. (1990): Effect of physical exercise on cytokines and lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *APMIS*, **98**, 395-400.

400)Wittels, P. Kanduth, B. (1995): Leucocytosis as marker of damage induced by chronic strenuous physical exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **72,** 187-188.

401)Rowbottom, DG. Green, KG. (2000) Acute exercise effects on the inmune system. *Med Sci Sports Exerc,* **32**, 396-405.

402)Baum , M. Greitner, T. Liesen, H. (1996) The role of the spleen in the leucocytosis of exercise consequences for physiology an pathophysiology. *Int J Sports Med,* **17,** 604-607.

403)Drenth, JP. Vander Meer, JM. (1999): Whole-blood cultures a valid and refiable tool for studyng cytokine in exercise. *Eur J Clin Invest***, 29**, 182-183.

404)Steel, CM. Hunt, AR. Adams, PL. Robertson, ID. Chicken, C. Yovich, JV. Stick, JA.(1999): Factors associated with prognosis for survical and athletic use in foals with septic arthritis. *J Am Med Assc,* **215**, 973-974.

405)Peters, AM. Hall, GM: (1994): Role of the spleen in leucocytosis after exercise. *Clin Sci***, 87,** 369-370.

(406)Nielsen, HB. Secher, NH. Kristensen, JH. Christensen, NJ. Espersen, K. Pedersen, BK. (1997) : Splenectomy impairs lymphocytosis during maximal exercise. *Am J Physiol*, **272,** 847-852.

407)Sato, H. Abe, T. Kikuchi, T. Endo, T. Hasegawa, H. Susuki, K. Nakaji, S. Sugawara, K. Ohta, S (1996): Changes in the production of reactive oxygen species from neutrophilis following a 100 km marathon, **51**, 612-616.

408)Benschop, RJ. Rodriguez-Fenerhahan, M. Schedlowski, M (1996) Catecholamine-induced leukocytosis early observations current research and future directions. *Brain Belav Immun*, **10**, 77-91.

409)Ceddia, MA. Price, EA. Kohlmeier, CK. Evans, JK. Lu, Q. Mc Auley, E. Woods, JA. (1999): Differential leukocytosis and lymphocyte mitogenic response to acute maximal exercise in the young an old. *Med Sci Sports Exerc*, **31,** 829-836.

410)Fry, RW. Morton, AR. Crowford, GP. Keast, D. (1992): Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **64,** 218-227.

411)Shinkai, S. Shore, S. Shek, PN. Shephard, RJ. (1992): Acute exercise and immune function. Relationship between lymphocyte activity and changer in subset counts. *Int J Sports Med,* **13,** 452-461.

412)Shek, PN. Sabiston, BH. Buguet, A. Radomski, MW.(1995): Strenuous exercise and immunological changes a multiple time point analysis of leukocyte subsets, CD4/CD8 ratio inmunoglobulin production and NK cell response. *Int J Sports Med*, **16**, 466-474.

413)Mac Kenzie, MA. Greenleaf, JE. Looft-Wilson, R. Barnes, RP. (1999): Leucocytisis, trombocytosis and plasma osmolality during rest and exercise an hypothesis, *J Physiol Pharmacol,* **50,** 259 -273.

414)Colbert, LH. Davis, JM. Essig, DA. Ghaffar, A. Moyer, EP. (2001): Tissue expression and plasma concentrations of TNF alpha, IL-1 beta, and IL-6 following treadmill exercise in mice. *Int J Sports Med,* **22,** 261-267.

415)Glesson, M. (1998): Are circulating cytokine receptors and ex vivo interleukin - 1 beta production in creased and tumour necrosis factoe-alpha production decreased after a 5 km run. *Eur J Clin Invest***, 28,** 873-874.

416)Klokker, M. Mohr, T. Kjaer, M. Galbo, H. Pedersen, BK. (1998); The natural killer cell response to exercise in spinal cord injured individuals. *Eur J Appl Occup Physiol*, **79,** 93-98.

(417)Weinstock, C. Koning, D. Harnischmacher, R. Keul, J. Berg, A. Northoff, H.(1999): Effect of exhautive exercise on the cytokine response. *Med Sci Sports Exerc,* **29,** 345-354.

418)Baum, M. klopping-Menke, K. Muller-Steinhardt, M. Liesen, H. Kirchner, H.(1999): Increased concentrations of interleukin 1- beta in whole blood cultures supernatants after 12 weeks of moderate endurance exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **79**, 93-98.

419)Ostrowski, K. Rohde, t. Zacho, M. Asp, S. Pedersen BK. (1998): Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol*, **508,** 949-053.

420)Steerenberg, PA. Van Asperen, IA. Van Nieuw Amerogen, A. Biewenga, A. Mol, D. Medema, GT.(1997): Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. *Eur J Oral Sci,***105**, 305-309.

421)Pyne, DB, Gleeson, M.(1998): Effects of intensive exercise trainning on immunite in athletes. *Int J Sports Med,* **19,** 183-191.

422)Asselin, P. Benquet, C. Krzystyniak, K. Brousseaus, P. Savard, R. Fournier, M.(1996): In vivo indomethacion reverse exercise-induced immunosuppression in rats. *Int J Immunopharmacol,* **18,** 491-497.

423)Walsh, NP. Blannin, AK. Clark, AN. Cook, L. Robson, PJ. Gleeson, M.(1999): The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA total protein and alpha-amylase. *J Sports Sci,* **17,** 129-134.

424)Gleeson, M. (2000): Mucosal immune responses and risk of respiratory illness in elite athletes. *Exerc Immunol,* **6,** 41-42.

425)Fahlman, MN. Engels, HJ. Morgan, AL. Kolotouri, I. (2001): Mocosal IgA response to repreated wingate test in female. *Int J Sports Med,* **22,** 127-131.

426)Bishop, NC. Blannin, AK. Armstrong, E. Rickman, M. Gleeson, M. (2000): Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flowrate and IgA response to cycling. *Ned Sci Sports Exerc***, 32,** 2046-2051.

427)Pedersen, BK. Hoffman-Goetz, L.(2000): Exercise and the immune sustem regulation integration and adaptation. *Physiol Rev***, 80,** 1055- 1081.

428)Brenner, I. Shek, PN. Zamecnik, K. Shephard, RJ. (1998): Stress hormones and immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med,* **19,** 130-143.

429)Woods, JA. (2000): Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *Int J Sports Med,* **21,** 24-30.

450)Nieman, DC. Nehlsen-Cannarella, SL. Fagoaga, OR. Hnson, DA. Shannon, M. Hjertman, JM. Schmitt, RL. Bolton, MR. Austin, MD. Schilling, BK. Thorpe, R. (2000): Immune function in female elite rowers and non- athetes. *Br J Sports Med*, **34**, 181-187.

(451)Sterzl, I. (1996): Neuroendocrine-inmune systems interactions and regulations. Folia *Biol Praha***, 42**, 67-69.

452)Woods, JA. (2000): Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *Int J Sports Med,* **21,** 24,30

453)Mazzeo, RS. (2000): Aging, immune function and exercise hormonal regulation. *Int J Sports Med*, **21**, 10-13.

454)Pedersen, BK. Bruunsgaard, H. Klokker, M. Kappel, M. Mac Lean, DA. Nielsen, HB. Rohde, T. Ullum, H. Zacho, M.(1997): Exercise induced immunomodulation possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. *Int J Sports Med*, **18**, 2-7.

455)Cross, MC. Radomski, NW. Van helder, WP. Rhind, SG. Shephard, RJ.(1996): Endurance exercise with and without a thermal clamp, effects on leukocytes and leukocyte subsets. *J Appl Physiol,* **81,** 822-829.

456)Suzuki, K. Totzuka, M. Nakaji, S, Yamada, M. Kudoh, S. Liu, Q. Sugawara, K. Sato, K. (1999): Endurance exercise causes interactions among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol,* **87**, 1360-1367

457)Goldfarb, AH. Jamurtas, AZ.(1997): Beta-endorphin response to exercise. A up date. *Sports Med,* **24,** 8-16.

458)Schwarz, L. Kindermann, W. (1992): Changes in beta-endorphin levels in response to aerobic and anaerobic exercise. *Sports Med,* **13,** 25-36.

459)Pedersen, BK. Hoffman-Goetz, L. (2000): Exercise and the immune system, regulation, and adaptation. *Physiol Rev*, **80,** 1055-1081.

460)Mackinnon, LT. (1998): Future directions in exerxise and immunology regulation and integration. *Int J Sports Med,* **19,** 209-211.

461)Punzón, C. Alcaide, A. Fresno, M. (2001) Modulationof TNF receptors by Phlebodium decumanum, *Centro de Biología Molecular (CBM) J Ethnopharmacol* (en publicación)

462)De Teresa, C. Alcaide, A. Huerta, J. Fresno, M (2002) Cycling performance and risks due to prolonged exercise training: of Phlebodium decumanum. *J Sports Med* (por publicarse)

463)Birrer, RB.(1998): Physical activity in the prevention and management of cardiovascular disease. *World. Rev Nutr Diet*, **82**, 191- 209

464)Garber, CE. (1997): The cardiovascular benefits of regular participation in physical activity. *Med Health RI,* **80,** 286-287.

465)Arslan, S. Erdem, S. Kilinc, K. Sivri, A. Tan, E. Hacelik, H.Z. (2001): Free radical changer in rat muscle tissue after exercise. *Rheumatol Int,* **20,** 109-112.

466)Faff, J. Frankiewicz-Jozko, A. (1997): Effect of ubiquinone on exercise-induced lipid peroxidation in rat tissues. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol,* **75**, 413-417.

467)Anuradha, C.V. Balakrishnan, S.D. (1998): Effect of training on lipid peroxidation, thiol status and antioxidant enzymes in tissues of rats. *Indian J Physiol. Pharmacol,* **42**, 64-70.

468)Hong, H. Johnson, P. (1995): Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in exercised and hypertensive rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol*, **27**, 923-931.

469)Salminen, A. Vihko, V. (1983): Endurance training reduces the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation in vitro. *Acta Physiol Scand,* **117,** 109-113.

470)Viinikka, L. Vuori, J. Ylikorkala, O. (1984): Lipid peroxides, prostacyclin and tromboxane A2 in runners during acute exercise. *Med Sci Sports Exercise,* **16**, 275-276.

471)Jimeno, B. Mayrnar, M. Gómez-Zubeldía, M.A. Gómez, M.M.G. Mena, P. Campillo, J.E. (1996): Efectos del ejercicio físico aeróbico sobre la peroxidación lipídica y los niveles de lípidos plasmáticos. *Archivos de Medicina del Deporte*, **55,** 333-337.

472)Meydani, M. Evans, WJ. (1993): Free radicals, exercise, and aging. *In: u BP, Ed. Free Radicals in Aging. Boca Raton, FL: CRS Press*, **45**, 183-204.

473)Sen, CK. (1995): Oxidants and antioxidants in exercise. *Jappl Physiol,* **79**, 675-686.

474)Ji, LL. (1999): Antioxidant and oxidative Stress in exercise. *Exp.Biol Med,* **222,** 283-292.

475)Halliwell, B. Gutteridge, JMC. (1989): Free Radicals in Biology and Medicine Oxford*: Clarendon Press,* **56**, 136-158.

476)Ames, BN. Shigenaga, MK. Hagen,TM. (1995): Mitochondrial decay in aging. *Biochem Biophys Acta,* **1271**,165-170.

477)Yu, BP. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, **74**, 139-162.

478)Arslan, S. Erdem, S. Kilinc, K. Sivri. A, Tan, E. Hascelik, HZ. (2001): Free radical changes in rat muscle tissue after exercise. *Rheumatol Int*, **20**,109-120.

479)Thomas, GD. Zhang, W. Victor, RG. (2001): Impaired modulation of sympathetic vasoconstriction in contracting skeletal muscle of rats with chronic myocardial infarctions role of oxidative stress. *Circ Res,* **27**, 816-823.

480)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 rat, role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IU BMB Life*, **49**, 539-544.

481)Hara, M. Ligo, M. Ohtani-Kaneko, R.Nakamura, N.Suzuki, T.Reiter, RJ. Hirata, K. (1997): Administration of melatonin and related indoles prevents exercise induced cellular oxidative changes in rats. *Biol Signals*, **6 ,** 90-100

482)Mataix, J. Quiles, JL. Huerta, JR, Battino, M. Mañas, M. (1998): Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med,* **24**, 511-521.

483)Bejma, J. Ramirez, P. Ji. LL. (2000): Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand,* **169,** 343-351.

484)Bejma, J. Ji, LL. (1999): Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol,* **87,** 465-470.

485)Lawler, JM. Powers, SK, Visser, T. Van Dijk, H. Kordus, MJ. Ji, LL. (1993): Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes effects of fiber type and age. *Am J Physiol,* **265,** 1344-1350.

486)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,** 192-1395.

487)Li, XJ. Xin, D. Li, H. Lu, JF. Tong, CW.Gao, JN. Chan, KM.(1999) Effect of verbasciside on decreasing concentration of oxygen fre radicals and lipid peroxidation in skeletal muscle. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* **20**, 126-130.

488)Varin, R.Mulde, P. Richard, V. Tamion, F. Devaux, C. Henry, JP. Lallemand, F. Lerebours, G. Thuillez, C. (1999): Exercise improves flow mediated vasodilation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide prostanoids and oxidant stress. *Circulation,* **99,** 2951-2957.

489)Bowles, DK. Starnes, JW. (1994): Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol*, **76**, 1608-1614.

490)Ji, LL. Dillon, D. Wu, E. (1991): Myocardial aging antioxidant systems and related biochemical properties. *Am J Physiol*, **261**, 92-96.

491)Jakus, V. Lopuchova, M. (1999): Role of free radicals, oxidative etress and antioxidant systems in liver diseases. *Bratisl Lek Listy*, **100**, 548-559.

492)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.

493)Halliwel, B. Gutteridge, JMC. (1989): Free radicals in biology and medicine. *Clarendon Press, Oxford*, **56 ,** 45-58.

494)Venditti, P. Di Meo, S. (1997): Effect of training on antioxidant capacity tissue damage and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med*, **18** ,497-502.

495)Yu, BP. (1994): Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, **74,** 139-162.

496)Davies, KJA. Quintanilha, TA. Brooks, GA. Packer, L.(1982): Free radical and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, **107,** 1198-1205.

497)Chance, B. Sies, H. Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev***, 59**, 527-605.

498)Kim, JD. McCarter, RJM. Yu, BP.(1996): Influence of age exercise and dietary restriction on oxidative etress in rats. *Aging Clin Exp Res,* **8,** 123-129.

499)Alessio, HM. Goldfar, AH. (1988): MDA content increases in fast and slow twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol***, 255**, 874-877.

500)Kumar, CT. Reddy, VK. Prasad, M. Thyagaruja, K. Reddanna, P. (1992): Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem,* **111**, 109-115.

501)Jackson, MJ. Edwards, RH. Symons, MC. (1985): Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta*, **847,** 185-190.

502)Reid, MB. Stokic, DC. Koch, SM. Khawli, FA. Lois, AA. (1994): N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest*, **94**, 2468-2474.

503)O`Neill, CA. Stebbins, CL. Bonigut, S. Halliwel, B. Longhurst, JC. (1996): Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle ot cat. *J Appl Physiol.* **81**, 1197-1206.

504)Ji, LL. Mitchell, EW. (1994): Effects of adriamycin on heart mitochondrial function in rested and exercised rats. *Biochem Pharmacol***, 47,** 877-885.

505)Downey, JM. (1990): Free radicals and their involvement during long-term myocardia ischemia-reperfusion. *Annu Rev Physiol*, **52,** 487-504.

506)Kuppasamy, P. Zweier, JL. (1989): Characterzation of fre radical generation by xantine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem*, **264,** 9880-9884.

507)Hellsten, Y. (1994): Xanthine dehydrogenase and purine metabolism in man. With special reference to exercise. *Acta Physiol Scand,* **621**, 1-73.

508)Norman, B. Sovelli, A. Kaijser, L. Jansson, E. (1987): ATP breakdown products in human muscle during prolonged exercise to exhaustion. *Clin Physiol*, **7**, 503-504.

509)Radak, Z. Asano, K. Inoue, M. Kizaki, T. Oh-Ishi, S. Suzuk, K. Taniguchi, N. Ohno, H. (1995): Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage inskeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Phyisiol***, 79**, 129-135.

510)Rasanen, LA. Wiitanem, PA. Lilius, EM. Hyyppa, S. Poso, AR. (1996): Accumulation of uric acid in plasma after repeated bouts of exercise in the horse. *Comp Biochem Phyisiol*,**114**, 139-144.

511)Simpson, PJ. Lucchesi, BR. (1987): Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med*, **19**; 1195-1206. 11. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* **79:**675-686, 1995

512).Sen, CK. (1995). Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* **79,** 175-686.

513)Kuppasamy, P. Zweier, JL. (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase: Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* **264,**9880-9884.

514)Ji, LL. Fu, RG. Mitchell, E. (1992) Glutathione antioxidant enzyme skeletal muscle Effect fiber type exercise intensity. *J Appl Physiol* **73,**1854-1859.

515)Ji, LL. Fu, RG. (1992) Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* **72,**549-554.

516)Ji, LL. Dillon, D. Wu, E. (1990) Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. Am J Physiol **258,** 918-923.

517)Lang, JK. Gohil, K. Packer, L. Burk, RF. (1987) Selenium deficiency, endurance exercise capacity, and antioxidant status in rats. *J Appl Physiol* **63,** 2532-2535.

518)Lawler, JM. Powers, SK. Visser, T. Van Dijk, H. Korthuis, MJ. Ji, LL (1993) Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: Effect of fiber type and age. *Am J Physiol* **265,**1344-1350.

519)Ohno, H. Suzuki, K. Fujii, J. Yamashita, H. Kizaki, T. Oh-ishi, S. Taniguchi, N.(1994) Superoxide dismutases in exercise and disease. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, *Eds. Exercise and Oxygen Toxicity. New York: Elsevier Science*,127-161.

520)Quintanilha, AT. Packer, L. (1983) Vitamin E, physical exercise, and tissue oxidative damage. *Ciba Found Symp,* **101,** 56-69.

521)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.

522)Ohno H, Yahata T, Sato, Y. Yamamura, K. Taniguchi, N. (1988): Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme systems in sedentary men. *Eur J Appl Physiol* **57,**173-176.

523)Ji, LL. (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* **25,**225-231.

524)Laughlin, MH. Simpson, T. Sexton, WL. Brown, OR. Smith, JK. Korthuis, RJ.(1990) Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J Appl Physiol* **68,**2337-2343.

525)Alessio, HM. Goldfarb, AH. (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training. *J Appl Physiol* **64,**1333-1336.

526)Oh-Ishi, S. Kizaki, T. Nagaswa, J. Izawa, T. Komabayashi, T. Nagata, N. Suzuki, K. Taniguchi, N. Ohno, H. (1997) Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content, and mRNA expression in rat muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24,**326-332.

527)Gore, M. Fiebig, R. Hollander, J. Ji, LL. (1997) Acute exercise alters mRNA abundance of antioxidant enzyme and nuclear factor B activition in skeletal muscle, heart, and liver. *Med Sci Sports Exerc* **29,** 229-237.

528)Remacle, J. Lambert, D. Raes, M. Pigeolet, E. Michiels, C. Toussaint, O. (1992) Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. *Biochem J* **286,** 41-46.

529)Jenkins, RR. (1988) Free radical chemistry: Relationship to exercise. *Sports Med* **5,** 156-170.

530)Ji LL. (1995) Exercise and oxidative stress: Role of the cellular antioxidant systems. In: Holloszy JO, Ed. *Exercise Sport Science Reviews. Baltimore*, MD: Williams & Wilkins, 135-166.

531)Laughlin, MH. Simpson, T. Sexton, WL. Brown, OR. Smith, JK. Korthuis, RJ. (1990) Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J Appl Physiol* **68,** 2337-2343.

532)Leeuwenburgh, C. Fiebig, R. Chandwaney, R. Ji, LL. (1994) Aging and exercise training in skeletal muscle: Response of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* **267,** 439-445.

533)Quintanilha, AT. (1984) The effect of physical exercise and/or Vitamin E on tissue oxidative metabolism. *Biochem Soc Trans* **12,** 403-404.

534)Jenkins RR. (1993) The role of superoxide dismutase and catalase in muscle fatigue. In: Knuttgen HG, Vogel JA, Poortmans J, *Eds. Biochemistry of Exercise. Champaign, IL: Human Kinetics Publishers*,467-471.

535)Hollander J, Fiebig R, Gore M, Bejma J, Ohno H, Ji LL. (1999) Superoxide dismutase gene expression: Fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol* **277,** 856-862.

536)Leeuwenburgh, C. Ji, LL.(1995) Glutathione depletion in rested and exercised mice: Biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* **316,**941-949.

537)Brady PS, Brady LJ, Ullrey DE. (1979) Selenium, vitamin E, and the response to swimming stress in rats. *J Nutr* **109,**1103-1109.

538)Vihko, V. Salminen, A. Rantamaki, J. (1978) Oxidative lysosomal capacity in skeletal muscle of mice after endurance training. *Acta Physiol Scand* **104,**74-79.

539)Leeuwenburgh, C. Ji, LL. (1996) Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J Nutr* **126,**1833-1843.

540)Ji, LL. Stratman, FW. Lardy, HA.(1988) Enzymatic downregulation with exercise in rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* **263,**137-149.

541)Ji, LL. Stratman, FW. Lardy, HA. (1988) Antioxidant enzyme systems in rat liver, and skeletal muscle: Influences of selenium deficiency, chronic training and acute exercise. *Arch Biochem Biophys* **263,**150-160.

542)Leeuwenburgh, C. Hollander, J. Leichtweis, S. Griffiths, M. Gore, M. Ji, LL. (1997) Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue- and muscle fiber-specific. *Am J Physiol* **272,**363-369.

543)Sen, CK. Marin, E. Kretzschmar, M. Hanninen, O. (1992) Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol* **73,**1265-1272.

544)Powers, SK. Criswell, D. Lawler, J. Ji, LL. Martin, D. Herb, R. Dudley, G.(1994) Influence of exercise intensity and duration on antioxidant enzyme activity in skeletal muscle differing in fiber type. *Am J Physiol* **266,**375-380.

545)Leichtweis, SB. Leeuwenburgh, C. Parmelee, DJ. Fiebig, R. Ji,LL. (1997): Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post ischaemic rat heart. Acta Physiol Scand, 160, 139-148.

546)Ji, LL. Dillon, D. Wu, E. (1991): Myocardil aging; antioxidant enzyme system and related biochemical properties. *Am J Phyisiol* , **261**, 386-392.

547)Leeuwenburgh, C. Leichtweis, S. Hollander, J. Fiebig, R. Gore, M. Ji, LL.(1996): Effect of acute exercise on glutathione deficient heart. *Mol Cell Biochem*, **156,** 17-24.

548)Reddy Avula, CP. Fernández, G. (1999): Modulation of antioxidant enzyme and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging* , **11**, 246-252.

549) 54. Kanter, MM. Nolte, LA. Holloszy, JO.(1993). Effect of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol* **74,** 965-969.

550)Tiidus, PM. Houston, ME (1993) Vitamin E status does not affect the responses to exercise training and acute exercise in female rats. *J Nutr* **123**, 834-840.

551)Packer, L. Almada, AL. Rothfuss, LM. Wilson DS.(1989) Modulation of tissue vitamin E levels by physical exercise. *Ann N Y Acad Sci* **570,** 311-321.

552)Gohil, K. Rothfuss, L. Lang, J. Packer, L.(1987) Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content. *J Appl Physiol* **63**,1638-1641.

553)Davies, KJ. Quintanilha, AT.Brooks, GA. Packer, L.(1982) Free radicals tissue danage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Comm*, **107**,1198-1205.

554)Ernster, L. Dallner, G. (1995) Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*, **1271**, 195-204.

555)Jensen, P. (1966) Antimycin insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particles. *Biochim Biophys Acta,* **157**, 167-174.

556)Hinckle, P. Butow, R. Racker, E. Chance, B. (1967). Partial resolution of enzymes catalysing oxidative phosphoriration. *J Biol Chem***, 242**, 5169-5173.

557)Loschen, G. Flohe, L. Chance, B.(1971)Respiratory chain linked H2O2 production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett,* **16**, 261-263.

558)Boveris, A. Oshino, N. Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J,* **128**, 617-630.

559)Gray, MW. Burger, G.(1999) Lang mitochondrial evolution, *Science,* **283**, 1476-1481.

560)Wallace, D. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283,** 1482-1488.

561)PF Chinnery, DM. (1999) Turnbull mitochondrial DNA amd disease. *Lancet***, 354**, 17-21.

562)Quiles, JL. (1995) Estudio comparativo de aceite de oliva y girasol sobre la peoxidación lipídica en ratas sometidas a ejercicio físico. Tesis Doctoral, *Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos,* Universidad de Granada.

563)Huerta, J.R. Battino, M. Mataix, J, Lenaz, G. (1991) Cytocrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamicynin liver of rats fed with dietary olive oil. *Biochem Biophys. Res Commun*, **181**, 375-382.

564)Dieterich, S. (2000) Expresión genética de enzimas antioxidantes en el corazón humano en miocardiopatías terminales. *Circulation,* **101**, 33-38.

565)Amherst, E. (1999) Antioxidantes y actividad física. *American Journal of Clinical Nutrition*, **72,** 637-646.

566)Reznick, A. Witt, EH. Matsumoto, M. packer, L. (1992) Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochem Biiophys Res Comm.* **189**, 801-806.

567)Levin, RL. Garland, D. Oliver, CN. Amici, A, Climent, I. Lenz, AG. Ahm, BW. Shaltiel, S. Stadtman, ER.(1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Meth Enzymol*. **186**, 464-478.

568)Frei, BM. Kim, MC. Ames, BN. Ubiquinol 10 is an effective lipid soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87,** 4879-4883.

569)Kagan, VE. Shvedova, A. Serbinova, E. Khan, S. Swanson, C. Powell, R. Packer, L. (1995) Dihydrolipoic acid: A universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. *Biochem Pharmacol*, **44**, 1637-1649.

570)Gohil, K. Rothfuss, L. Lang, J. Packer, L. (1987) Efectos del entrenamiento físico en el contenido de vitamina E y ubiquinona en los tejidos. *J Appl Physiol*, **4**, 1638-1641.

571)Taggart, DP. Jenkins, M.(1996) Effects of term supplementation with coenzyme Q-10 on myocardial protection during cardiac operations. *Ann Thorac Surg***, 61**, 829-833.

572)Leibovitz, B. Hu, ML. Tappel, Al. (1990)Dietary supplements of vitamin E, beta carotene, coenzyme Q10 and selenium protect tissues against lipid peroxidation im rat tissue slice. *J Nutr,* **120**, 97-104.

573)Shimomura, Y. Sukuki, M. Sugiyama, S. Hanaki, Y. Ozawa, T. (1991) Protective effect of coenzyme Q10 on exercise induced muscular injury. *Biochem Biophys Res Comm*, **176,** 349-355.

574)Zuliani, U. Bonetti, M. Campana, G. Cerioli, Solito, F. Novarini, A.(1989) The influence of ubiquinone (CoQ10) on the metabolic response to work. *J Sports Med Physical Fitness*, **29**, 57-62.

575)Gollnick, P.D. Bertocci, L.A. Kelso, T.B.Witt, E.H. Hodgson, D.R.(1990) The effect of high intensity exercise on the respiratory capacity of skeletal muscle. *Pflugers Arch,* **415**, 407-413.

576)Niki, E. (1991) Action of ascorbic acid as acavenger of active and stable oxygen radicals. *Nutr Cancer*. **15,** 251-252.

577)Goldfarb, AH. Mcintosh, MK. Boyer, BT. (1996) vitamin E attenuates myocardial oxidative stress induced by DHEA in rested and exercised rats. *J Appl Physiol***. 80**, 486-490.

578)Tiidus, PM. Bombardier, E. Hidiroglou, H. Madere, R (1999) Gender and exercise influence on tissue antioxidant vitamin status in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. **45**, 701-710.

579)Cisnero, E (1999) La glutation reductasa y su importancia biomédica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, **14,** 1-3

580)Singh, VN (1992) A current perspective of nutrition and exercise. *J Nutr,* **122**, 760-765.

581)Pincemail, J. Camus, G. Roesgen, A. Dreezen, E. Bertrand, Y. Lismonde, M. Deby-Dupont, G. Deby, C.(1990). Exercise induces pentane production and neutrophil activation in humans: Effect of propanolol. *Eur J Appl Physiol* **61:**319-322.

582)Broche V, F. García P, J. Peña S, M. Delgado G, A. (2000) El estrés oxidativo en la conservación de órganos. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. **15**, 4-6.

583)Nayler, WG. (1980) The use of coenzyme Q10 to protect ischemic heart muscle. In Biomedical and Clinical Aspects of coenzyme Q10. *Elsevier North Holland Press. NY*, **2**, 409-424.

584)Hano, O. Thompson , SL. Zweier, JL. (1998) Coenzyme Q10 enhances cardiac functional and metabolic recovery and reduces Ca2+ overload during postischemic reperfusion. *Am J Physiol*, **266,** 174-181.

585)Matsumoto, H. Miyawaki, F.(1994) Effect of coenzyme Q 10 pretreatment on myocardial preservation. *Heart Tansolantation*. **3**, 160-165.

586)Buja, M. Bicck, RJ. (1996) Control and modulation of neonatal myocyte calcium movements by cytokines. *Promega Notes*. **47,** 6-9.

587)Odetti, P.(1994) Relationships between glycation and oxidation related fluorescences in rat collagen during aging an in vivo and in vitro study. *Lab Invest*. **70,** 61-67.

588)yamaoka, S. Urane, R. Kito, M. (1990) Cardiolipin molecular species in rat heart mitochondria are sensitive to essential fatty acid-deficient dietary lipids. *Free Rad. Bio.Med***. 10**, 149-159.

589)Asson-Batre, M.A. Hare, J.F. (1991) Effect of oxygen on the synthesis and assembly of nitochondrial encoded subunits of cytochrome oxidase and cytochrome c1 in mouse embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem* **266**, 9932-937.

590)Gohil, K. Packer, L. De Lumen, B. Brooks, GA. Terblanche, SE. (1986) Vitamin E deficiency and vitamin C supplements , exercise and mitochondrial oxidation. *J Appl Physiol*, **60**, 91-94

591)Loschen, G. Azzi, A. Richter, C. Flohe, L. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett***, 42**; 68-72.

MIGUEL DE CERVANTES

ANEXOS

CANTIDAD DE RACIÓN ALIMENTICIA NO INGERIDA POR CADA GRUPO DE RATAS:

	Cantidad de ración no ingerida por las ratas (g)			
Fecha/ Grupos	**Grupo E**	**Grupo E+PD**	**Grupo S+PD**	**Grupo S**
29 enero	75,4	70,6	0	23,4
30 enero	79,7	79,8	6,2	24,3
31 enero	85,4	77,8	5,4	30,1
1 febrero	114,7	107,7	0	30,0
2 febrero	134,5	137,5	12,3	25,6
3 febrero	128,6	137,3	27,1	35,8
4 febrero	102,8	119,6	5,9	11,6
5 febrero	110,9	102,7	0	36,1
6 febrero	109,1	82,1	4,6	47,3
7 febrero	101,1	95,6	15,3	33,1
8 febrero	79,5	91,4	29,1	45,0
9 febrero	78	87,9	16,4	42,6
10 febrero	76,3	55,6	19,6	44
11 febrero	97,7	65,4	7,5	25,4
12 febrero	94,6	98,2	14,6	23,5
13 febrero	91,1	98,4	17,8	38,8
14 febrero	73,1	74,5	51,6	69,1
15 febrero	116,7	75	47,9	72,4
16 febrero	96,2	77,8	45	98,1
17 febrero	72,5	58,9	31,9	79,4
18 febrero	90,7	78,0	27,2	66,9
19 febrero	112,0	127,5	50,1	44,0

PROTOCOLO DE EXTENUACIÓN FÍSICA DE LAS RATAS DEL GRUPO (E) (E+PD)

Días/Veloc	V_1 (m/min)	V_2 (m/min)	V_3 (m/min)	V_4 (m/min)	Velocidad media m/min)	Volumen (m)
22 enero	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	1698
23 enero	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	1698
24 enero	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	1698
25 enero	31,4	31,4	31,4	36,3	32,6	1957,5
26 enero	31,4	31,4	31,4	36,3	32,6	1957,5
27 enero	35,0	35,0	40,2	40,2	37,6	2256
28 enero	35,0	35,0	40,2	40,2	37,6	2256
29 enero	32,6	37,5	39,5	42,5	38,0	2281,5
30 enero	32,6	37,5	39,5	42,5	38,0	2281,5
31 enero	32,6	37,5	39,5	42,5	38,0	2281,5
1 febrero	33,1	37,3	41,3	46,3	39,5	2370
2 febrero	33,1	37,3	42,0	43,7	39,0	2341,5
3 febrero	34,1	36,8	40,6	42,8	39,0	2314,5
4 febrero	33,5	38,5	41,5	45,0	39,6	2377,5
5 febrero	33,5	38,5	41,5	45,0	39,6	2377,5
6 febrero	33,5	38,0	42,5	46,0	40,0	2400
7 febrero	35,6	38,7	43,0	48,4	41,4	2485,5
8 febrero	34,7	40,3	41,5	44,7	40,3	2418
9 febrero	36,3	42,2	44,7	46,5	42,4	2545,5
10 febrero	36,3	41,5	44,7	46,5	42,2	2535
11 febrero	36,9	40,7	42,2	46,5	41,5	2494,5
12 febrero	36,3	38,7	43,0	46,5	41,1	2467,5
13 febrero	38,7	43,0	44,7	50,5	44,2	2653,5
14 febrero	40,0	43,0	44,7	50,5	44,7	2683,5
15 febrero	40,0	43,0	44,7	50,5	44,7	2683,5
16 febrero	37,5	41,5	43,8	48,4	42,8	2568
17 febrero	37,5	41,5	43,8	48,4	42,8	2568
18 febrero	37,5	41,5	43,8	48,4	42,8	2568

CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE LA MASA CORPORAL DE LAS RATAS DEL GRUPO E

	Día 1	Día 9	Día 17	Día 24	Día 31	Día 38	Día 45	Sacrif.
1	247,8	257,5	254,2	253,1	232,4	229,0	223,1	**223,1**
2	249,0	258,2	284,1	298,9	302,4	259,9	250,8	—
3	260,7	282,2	296,5	314,6	305,2	275,1	256,3	—
4	276,3	297,1	305,8	315,4	307,2	281,4	258,8	**258,8**
5	302,5	322,2	333,8	333,2	309,3	296,8	288	**288**
6	308,3	324,8	339,2	333,3	312,0	299	290	**290**
7	311,0	331,4	345,2	344,7	343,4	314,1	294,1	**294,1**
8	325,7	338,8	347,5	359,4	343,9	329,9	298,8	**298,8**
9	327,0	345,5	358,7	367,4	350,1	340,1	326,8	**326,8**
10	311,0	356,4	368,1	369,9	362,6	350,8	343,6	**343,6**
Total	2951,0	3114,1	3233,1	3289,9	3168,5	2976,1	2830,6	—

OBS: Los pesos del día 18 equivalen a los de las ratas sacrificadas. Las que están sin valores son las ratas no seleccionadas para el sacrificio.

CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE LA MASA CORPORAL DE LAS RATAS DEL GRUPO E+PD

	Día 1	Día 9	Día 17	Día 24	Día 31	Día 38	Día 45	Sacrif.
1	287,1	306,2	319,1	324,5	296,6	276,2	248,3	—
2	288,2	309,5	325,9	332,2	311,8	285,9	264,9	**264,9**
3	304,1	320,6	330,8	334,7	322,9	286,3	275,2	**275,2**
4	306,2	325,6	332,1	335,4	328,3	303,1	291,3	**291,3**
5	320,6	328,6	334,3	342,0	329,8	305,4	297,2	—
6	325,9	332,1	340,9	344,5	343,2	316,9	304,4	**304,4**
7	327,6	349,2	365,8	371,6	351,6	340,1	329,2	**329,2**
8	328,8	353,5	367,5	372,4	352,6	347,5	339,5	**339,5**
9	329,5	354,4	369,2	384,5	363,2	354,9	350,7	**350,7**
10	347,4	360,4	373,4	392,1	384,8	363,7	364,6	—
Total	3165,2	3340,1	3459,0	3533,9	3384,8	3180,0	3065,3	—

OBS: Los pesos del día 18 equivalen a los de las ratas sacrificadas. Las que están sin valores son las ratas no seleccionadas para el sacrificio.

CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE LA MASA CORPORAL DE LAS RATAS DEL GRUPO S+PD

	Día 1	**Día 9**	**Día 17**	**Día 24**	**Día 31**	**Día 38**	**Día 45**	**Sacrif.**
1	256,7	270,5	289,5	317,0	327,9	334,5	345,5	**345,5**
2	275,4	288,7	306,4	333,9	340,4	345,2	347,9	**347,9**
3	293,6	313,5	334,0	360,1	376,1	382,6	393,4	—
4	303,5	317,3	338,1	367,2	385,9	390,6	403,7	**403,7**
5	313,0	321,9	339,6	369,5	386,3	398,8	404,4	**404,4**
6	319,7	343,5	358,6	385,4	395,2	399,2	406,7	—
7	331,2	344,8	370,9	390,4	403,8	409,8	418,1	**418,1**
8	332,1	350,9	373,1	403,5	419,6	425,1	431,1	**431,1**
9	341,6	360,9	382,1	406,5	420,9	428,2	434,5	**434,5**
10	360,5	368,1	385,3	408,7	423,3	434,3	439,7	**439,7**
Total	3127,3	3280,1	3477,6	3742,2	3879,4	3948,3	4025,0	—

OBS: Los pesos del día 18 equivalen a los de las ratas sacrificadas. Las que están sin valores son las ratas no seleccionadas para el sacrificio.

CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE LA MASA CORPORAL DE LAS RATAS DEL GRUPO S

	Día 1	**Día 9**	**Día 17**	**Día 24**	**Día 31**	**Día 38**	**Día 45**	**Sacrif.**
1	240,1	250,9	263,2	287,9	297,5	309,5	310,9	—
2	245,3	257,2	275,6	306,1	313,6	316,9	323,8	**323,8**
3	261,4	277,2	298,2	323,8	331,9	337,1	338,7	—
4	297,6	306,5	320,5	339,4	347,4	354,8	353,7	**353,7**
5	316,4	322,4	333,9	356,9	363,6	365,2	370,1	**370,1**
6	318,6	343,4	362,0	392,2	402,7	411,9	420,1	**420,1**
7	332,0	348,2	364,0	398,9	410,1	415,3	423,8	**423,8**
8	333,6	357,3	376,9	405,9	419,5	428,2	425,1	**425,1**
9	335,2	358,3	380,1	413,8	422,2	431,0	435,0	**435,0**
10	342,6	360,5	384,1	414,9	430,5	441,2	444,1	**444,1**
Total	3022,8	3181,9	3358,5	3639,8	3739,0	3811,1	3844,7	**3844,7**

OBS: Los pesos del día 18 equivalen a los de las ratas sacrificadas. Las que están sin valores son las ratas no seleccionadas para el sacrificio.

HIGADO				
VARIABLES	***S***	***S+PD***	***E***	***E+PD***
ROOH (nmol/mg)	44,0±1,5 c	42,4±0,8 c	127.5±11.9 a	80,3±6.7 b
TBARS (nmol/mg)	2,7±0,3 b	1.6±0,3 b	8.2±0,8 a	6.1±0,3 a
VE (Fg/mg)	1.7±0,2 a	1.6±0,3 a	1.5±0,3 a	1.5±0,1 a
VA (ng/mg)	29,3±1,9 a	26,4±1,5 a	31,5±1,8 a	38,4±3,8 a
CoQ_9 (Fg/mg)	1,6±0,1 c	2,1±0,3 bc	3,9±0,3 ab	4,5±0,4 a
SOD (U/mg)	13,0±0,9 b	14,6±0,4 ab	17,6±0,8 a	16,8±0,7 ab
CAT (seg.-1.mg.1)	0,33±0,03 a	0,28±0,03 a	0,28±0,04 a	0,32±0,03 a
GPX (U/mg)	0,23±0,05 a	0,14±0,04 a	0,38±0,02 b	0,12±0,01 a
$a+a_3$ (nmol/mg)	0,10±0,02 a	0,14±0,02 a	0,16±0,03 a	0,17±0,03 a
b (nmol/mg)	0,14±0,02 a	0,15±0,01 a	0,22±0,02 a	0,19±0,01 a
$c+c_1$ (nmol/mg)	0,22±0,02 a	0,19±0,03 a	0,22±0,03 a	0,21±0,03 a
Cit. Oxidasa (Fmol/mg.min)	3,8±0,8 a	2,8±0,2 a	2,5±0,8 a	3,5±0,8 a
Turnover (nmol/mg.seg)	510,4±185 a	420,6±140 a	399,6±155 a	562,0±188 a

Resultados obtenidos en el tejido hepático en los cuatro grupos de animales. Las diferencias significativas (p<0,05) se ilustran con diferentes letras.

MUSCULO ESQUELETICO				
VARIABLES	***S***	***S+PD***	***E***	***E+PD***
ROOH (nmol/mg)	13,5±0,7 b	12,7±0,6 b	19,8±0,8 a	14,9±0,9 ab
TBARS (nmol/mg)	3,5±0,2 b	3,0±0,4 b	12,8±0,6 a	10,0±0,7 b
VE (Fg/mg)	0,23±0,03 a	0,44±0,01 a	0,57±0,07 ab	0,83±0,09 b
VA (ng/mg)	23,0±1,0 a	24,0±0,9 a	26,6±1,1 a	28,3±1,8 a
CoQ_9 (Fg/mg)	1,4±0,1 a	1,5±0,6 a	1,8±0,3 a	2,8±0,1 b
SOD (U/mg)	14,5±1,2 a	11,9±1,4 a	14,2±1,1 a	17.2±0,5 a
CAT (seg.-1.mg.1)	0,41±0,08 a	0,36±0,05 a	1,8±0,3 b	0,29±0,1 a
GPX (U/mg)	0,20±0,07 a	0,21±0,08 a	0,23±0,01 a	0,22±0,08 a
$a+a_3$ (nmol/mg)	0,15±0,03 a	0,19±0,03 a	0,25±0,07 a	0,27±0,02 a
b (nmol/mg)	0,13±0,02 b	0,16±0,02 b	0,19±0,04 b	0,34±0,05 a
$c+c_1$ (nmol/mg)	0,15±0,05 b	0,20±0,04 b	0,40±0,06 b	0,42±0,07 a
Cit. Oxidasa (Fmol/mg.min)	1,9±0,3 ab	3,3±0,9 b	0,1±0,07 a	0,7±0,1 a
Turnover (nmol/mg.seg)	321,8±89,1 c	316.9±103 c	6,0±2.1 a	116±70,5 b

Resultados obtenidos en el tejido del músculo esquelético en los cuatro grupos de animales. Las diferencias significativas (p<0,05) se ilustran con diferentes letras.

CORAZON				
VARIABLES	***S***	***S+PD***	***E***	***E+PD***
ROOH (nmol/mg)	9,9±0,4 c	4,1±0,9 b	14,8±0,9 a	13,3±0,9 ac
TBARS (nmol/mg)	4,6±0,7 b	6,8±1,0 b	18,2±1,4 a	11,7±1.3 B
VE (Fg/mg)	0,45±0,2 a	0,65±0,2 a	0,20±0,03 b	0,49±0,08 a
VA (ng/mg)	35,3±2,3 a	38,3±2.2 a	35,1±1,9 a	41,3±2.4 a
CoQ_9 (Fg/mg)	6,1±0,9 ab	6,8±0,9 a	3,8±0,1 b	6,7±0,7 a
SOD (U/mg)	15,4±0,4 a	13,4±0,5 a	13,7±1,0 a	15,9±1,2 a
CAT (seg.-1.mg.1)	0,60±0,16 a	0,69±0,12 a	0,64±0,04 a	0,84±0,10 a
GPX (U/mg)	0,74±0,01 b	0,60±0,01 b	0,12±0,02 a	0,51±0,01 b
$a+a_3$ (nmol/mg)	0,34±0,05 a	0,33±0,07 a	1,0±0,2 a	1,9±0,2 b
b (nmol/mg)	0,40±0,07 a	0,42±0,09 a	0,40±0,07 a	0,70±0,19 b
$c+c_1$ (nmol/mg)	0,78±0,07 c	0,55±0,08 c	1,2±0,3 a	1,8±0,3 b
Cit. Oxidasa (Fmol/mg.min)	22,3±6,1 a	26,8±5,7 a	11,7±2,6 b	17,0±4,2 ab
Turnover (nmol/mg.seg)	813.6±150 b	1474,3±190 b	215,0±65.5 a	226,4±68.7 a

Resultados obtenidos en el tejido miocardico en los cuatro grupos de animales. Las diferencias significativas (p<0,05) se ilustran con diferentes letras.

PESOS (gramos)					
VARIABLES	PESO PONDERAL	PESO SACRIFICIO	PESO HÍGADO	PESO MÚSCULO	PESO CORAZÓN
S	302.2±12.4 (a)	399.4±15.5 (b)	11.5±0.52 (b)	10.5±0.64 (b)	1.02±0.02 (a)
S+PD	312.7±9.9 (a)	403.1±13.1 (b)	10.8±0.57 (b)	10.0±0.48 (b)	1.02±0.02 (a)
E	219.9±9.7 (a)	290.4±13.2 (a)	8.5±0.37 (a)	7.3±0.52 (a)	0.93±0.04 (a)
E+PD	316.5±6.1 (a)	307.8±12.4 (a)	8.8±0.66 (a)	8.3±0.54 (ab)	0.99±0.0 2 (a)

Pesos ponderales y de órganos de los cuatro grupos de animales expresados en gramos. Las diferencias significativas (p<0,05) se ilustran con letras diferentes.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

PLASMA				
VARIABLES	S	S+PD	E	E+PD
VITAMINA E Fg/ml	18.3±1.1 (c)	13.8±1.1 (ac)	8.0±1.3 (ab)	3.7±2.0 (b)
VITAMINA A ng/ml	392.7±40.2 (b)	274.4±74.8 (ab)	161.4±21.5 (a)	134.3±13.9 (a)
CoQ_9 ng/ml	202.3±17.7 (a)	169.6±36.0 (a)	140.3±22.0 (a)	158.0±26.3 (a)

Concentraciones de antioxidantes en plasma en los cuatro grupos de animales. Las diferencias significativas (p<0,05) se ilustran con letras diferentes

R E S U M E N

Aunque las evidencias científicas actuales permiten recomendar una vida físicamente más activa para promocionar la Salud Pública, es frecuente la práctica del ejercicio a intensidades superiores a las deseables para conseguir dichos objetivos. De hecho, cuando la intensidad del ejercicio supera a la del umbral anaeróbico, aumenta el riesgo de sufrir ciertas alteraciones orgánicas, debido en parte a una disfunción del sistema inmune y a la producción de radicales libres al incrementarse el consumo de oxígeno durante el ejercicio.

El *Phlebodium decumanum (PD)* es un helecho con propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes con potenciales efectos protectores al parecer, frente a los riesgos del sobreesfuerzo.

El objetivo del estudio ha sido conocer los efectos del *Phlebodium decumanum* frente a los posibles daños provocados por el ejercicio de alta intensidad en animales de experimentación. De un total (n=32) de ratas, 16 fueron sometidas a un sobreesfuerzo diario en cinta rodante durante 4 semanas, 7 veces a la semana, a una velocidad creciente entre 35 y 48 m/min durante 60 minutos.

Tanto la mitad del grupo experimental de ratas extenuadas (n=16) como las del grupo control sedentarias (n=16) se les suplió la dieta con PD. Tras el sacrificio, se estudiaron los tejidos hepático, músculo esquelético, cardiáco y plasma, midiéndose los hidroperóxidos (ROOH), las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), las concentraciones de antioxidantes (VE,VA y CoQ_9) la actividad enzimática antioxidante (SOD, CAT y GPX), la funcionalidad mitocondrial (citocromos $a+a_3$,b, $c+c_1$, citocromo oxidasa y turnover) y las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF alfa, como también los receptores solubles ($TNF\text{-}r_s$) y antagonistas de la IL-1 (IL-1-ra)

Los resultados obtenidos muestran en algunos órganos niveles, significativamente ($p<0.05$) menores de los biomarcadores de peroxidación lipídica y cambios favorables en la concentración y en la actividad antioxidante. Observándose además efectos favorables sobre algunos componentes de la cadena de transporte electrónico (CTE) en la funcionalidad mitocondrial, en aquellos animales con ingesta de PD a las 24 horas de finalizar el esfuerzo. No obstante, no se encontraron resultados en los parámetros de inmunosupresión al no obtenerse los niveles mínimos detectables para su medición.

Concluyéndose que al parecer existe una tendencia a la protección del *Phlebodium decumanum* frente al estrés oxidativo inducido por el sobreesfuerzo físico, siendo necesario ampliar los estudios sobre otras variables implicadas en los procesos oxidativos inducidos por el ejercicio físico extenuante.