



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Proyecto fin de master: Iniciación en la investigación
en medicina

EFECTOS DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE LA FLUIDEZ DE SARCOLEMA Y MITOCONDRIA EN RATA WISTAR

Estudiante: EMMA LARA NAVARRO

Área: Fisiología (410)

Profesores responsables: José Joaquín García García

Enrique Martínez Ballarín.

Zaragoza, 15 de Junio de 2012

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN:	2
2. MATERIAL Y MÉTODOS	8
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	8
2.2 PRUEBAS DE ESFUERZO	9
2.3 MATERIAL	10
2.4 AISLAMIENTO DE LOS SARCOLEMAS Y MITOCONDRIAS	12
2.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	13
2.6 MEDICIÓN DE LA FLUIDEZ EN LAS MEMBRANAS CELULARES	13
2.7 MÉTODOS ESTADÍSTICOS	15
3. RESULTADOS	16
3.1 SARCOLEMA	16
3.2 MITOCONDRIAS	17
4. DISCUSIÓN	18
5. CONCLUSIONES	19
6. BIBLIOGRAFÍA	20

1. INTRODUCCIÓN:

El ejercicio físico agudo genera una respuesta aguda sistémica al estrés en el cuerpo humano que conlleva un aumento de la frecuencia cardíaca, la presión arterial (ACSM, 2001), la temperatura corporal (Atkinson, 2005) y el consumo de oxígeno (VO_2) (Cazzorla, 2003), además de modificaciones locales en la fibra muscular (Goldfarb, 2004). Por ello, el organismo debe ser capaz de adaptarse para reducir el inevitable daño tisular ocasionado. A ello ayuda la repetición de estos estímulos, como es el caso del entrenamiento, lo que se traduce en multitud de hechos, entre otros bradicardia en reposo, mayor elasticidad de los vasos sanguíneos, mejora de la termorregulación, hipertrofia muscular, descenso del hematocrito, etc. (Wilmore, 1998). Está ampliamente demostrado que dichas adaptaciones son beneficiosas para el organismo y ayudan a prevenir algunas patologías cardiovasculares, metabólicas y oncológicas (ACSM, 2001).

Todos los músculos esqueléticos están formados por numerosas fibras cuyos diámetros varían entre 10 y 80 micrómetros. Cada una de estas fibras está formada a su vez por subunidades sucesivamente más pequeñas. En la mayor parte de los músculos, las fibras se extienden en toda la longitud del mismo. Cada una está inervada por una sola terminación nerviosa, localizada cerca de su porción media.

El sarcolema es la membrana celular de la fibra muscular. Esta está constituido por una membrana celular verdadera, y por una cubierta exterior formada por una fina capa de material polisacárido que contiene numerosas fibrillas finas de colágeno (Guyton 2001).

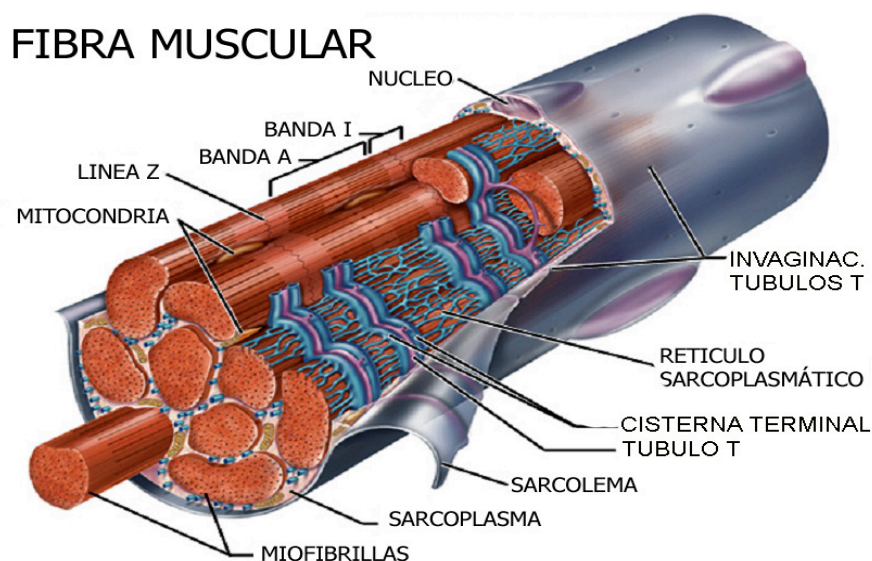


Figura 1: Componentes de la fibra muscular esquelética

Las membranas de las células eucariotas no son estructuras estáticas sino que por el contrario se caracterizan por ser plásticas y elásticas. Su espesor es de unos 5 nm. de espesor, formadas básicamente por una doble capa de lípidos, entre los que se intercalan proteínas que atraviesan total o parcialmente la bicapa. Entre los lípidos destacan los fosfolípidos: fosfatidilcolina, esfingomieline, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, aunque también hay una concentración importante de esteroides, principalmente colesterol. Las membranas también contienen pequeñas cantidades de glúcidos que se encuentran formando parte de glucoproteínas y glucolípidos (Figura 2). La proporción exacta de todas estas moléculas varía según el tipo de membrana celular y guarda una estrecha relación con su función.

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

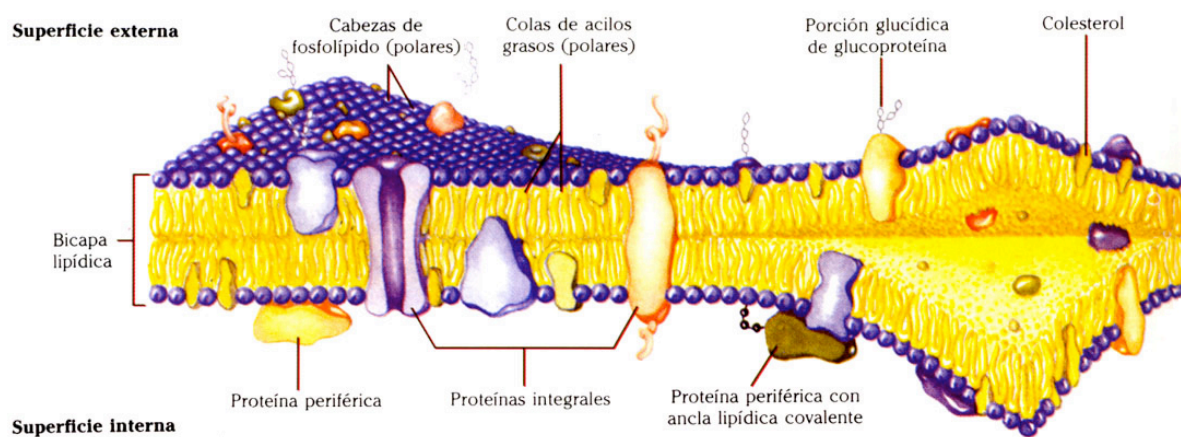


Figura 2. *Modelo de mosaico fluido por el que se representa la estructura de las membranas celulares.*

Los lípidos y proteínas de la membrana forman un mosaico fluido debido a que las uniones entre lípidos y de ellos con las proteínas son enlaces débiles o no covalentes. Esto permite el movimiento de las moléculas divididos en 4 tipos (Figura 3):

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

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

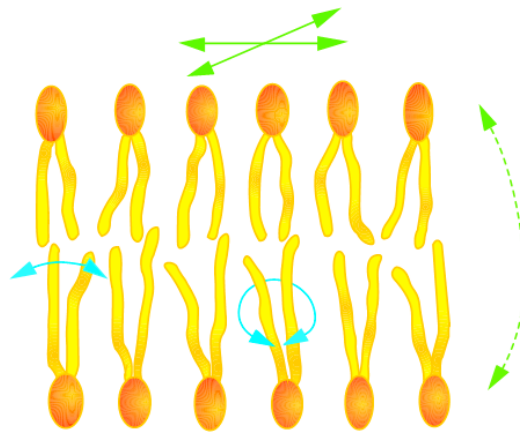


Figura 3 *Movimientos de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de una membrana celular. Las flechas verdes indican los que implican un desplazamiento neto de la molécula y las azules los que no suponen desplazamiento neto.*

Es un hecho aceptado que las membranas biológicas requieren un estado fluido para desarrollar sus funciones correctamente. Por ello, conocer la estructura y las

propiedades físicas de la bicapa constituyen la base para explicar multitud de procesos fisiológicos relacionados directa o indirectamente con la membrana. El transporte de iones y nutrientes, los procesos de transducción de señales que utilizan receptores localizados en la membrana, la acción de enzimas como ATPasas, adenilato ciclasa, la agregación plaquetaria, la fagocitosis, algunas funciones relacionadas con la inmunidad son buenos ejemplos de actividades celulares moduladas por el comportamiento físico de los lípidos de la membrana (Heron, 1980).

Debido a la composición de las membranas celulares, estas son muy susceptibles de ser atacadas por los radicales libres. El principal efecto que tienen estos es iniciar la peroxidación lipídica (LPO), que afecta a los fosfolípidos alterando su composición y estructura, sobre todo si estos son poliinsaturados, debido a la cantidad de dobles enlaces que estos poseen (Gutteridge, 1995). Debido a esto debemos tener en cuenta que si la relación entre ácidos poliinsaturados/saturados disminuye, lo hace también la fluidez de la membrana. Además, la interacción de los lípidos con los radicales libres produce enlaces cruzados entre lípidos y entre lípidos y proteínas, los cuales también afectan a la membrana aumentando su rigidez. Este cambio en su fluidez afecta a todas las funciones antes descritas.

Los radicales libres son cualquier especie química, átomo, moléculas o parte de estas, con existencia independiente, que posea un electrón o más desapareados en su orbital más externo. Tienen una vida media muy corta. Pueden actuar como reductores si son donantes de electrones, o como oxidantes, si son aceptores de electrones. El organismo produce continuamente especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres como resultado del metabolismo oxidativo normal que tiene lugar en la mitocondria (Traber 2006). Las ROS las constituyen tanto los radicales libres formados a partir del oxígeno como sus precursores. Por ello, para que se mantenga una homeostasis, debe haber un equilibrio entre mecanismos prooxidantes y antioxidantes. Los antioxidantes son moléculas que eliminan radicales libres, evitando su formación o bien reduciendo su acción. Cuando ese equilibrio se desiguala a favor de la formación de las especies oxidantes se produce una situación de estrés oxidativo. Éste puede alterar la composición de la membrana, modificando su estructura fosfolipídica (Cazzorla 2003). La LPO, que afecta a la dinámica de los fosfolípidos de la membrana, reduciendo su fluidez. Lo que agrava la producción de más ROS, que dañan estructuras vecinas (Urso 2003). Si las ROS oxidan los lípidos de la membrana, se generan malondialdehído (MDA) y 4-hidroxialquenos (4-HDA) como

metabolitos finales. Por otro lado, la aparición de grupos o restos carbonilo (PC) ocurre cuando lo que se ve afectado por los radicales libres son las proteínas (Bloomer 2007). Durante la LPO los radicales libres alteran los lípidos y, por ello, la fluidez y permeabilidad de la membrana disminuyen (Metin 2003).

Los organismos aeróbicos producen radicales libres como consecuencia del metabolismo del oxígeno, y, obviamente, el ejercicio causa un incremento en la utilización de oxígeno en la mitocondria, dando una elevada generación de radicales. Del 2 al 5% del oxígeno consumido (VO_2), durante el metabolismo normal de la mitocondria en organismos aeróbicos puede ser convertido en radicales y sus productos (Boveris 1972).

El papel de la mitocondria en la producción de radicales libres durante el ejercicio está en investigación. El incremento en el aporte de oxígeno es debido a un aumento sustancial en la producción de radicales libres generados en la respiración mitocondrial (Jackson 2007).

La valoración bioquímica del estrés oxidativo se realiza normalmente usando los marcadores arriba señalados, así como por la medición de las concentraciones de antioxidantes enzimáticos o no. Cuantificar radicales libres directamente es muy complejo y son necesarias técnicas como la resonancia del spin magnético (De Moffarts 2005). No obstante, la fluidez de membrana de las células, la concentración de MDA + 4-HDA y el contenido de PC son utilizados como indicadores indirectos de estrés oxidativo (Cazzorla 2003).

Se cree que el ejercicio aumenta la producción de radicales libres y ROS (Jackson 2005, Mc Ardle 2005 y Bloomer 2006). El aumento de metabolismo aeróbico durante el ejercicio es una fuente potencial de estrés oxidativo (Leeuwenburgh 2001) que se traduce en LPO (Traber 2006). No obstante, no todos los tipos de ejercicio causan un efecto de intensidad similar sobre el estrés oxidativo. Un esfuerzo moderado realizado durante un periodo prolongado de tiempo parece tener escasa influencia sobre la producción de radicales libres (Durstine 1994, Blair 1995 y Bailey 2004), mientras que un esfuerzo de gran intensidad provoca un incremento de estrés oxidativo (Shaper 1991, Lee 1995). Aun así, la respuesta a esta situación puede ser distinta en diferentes organismos, ya que depende en gran medida del nivel de antioxidantes o el VO_2 (Liu 2000).

Se ha postulado que el ejercicio a largo plazo incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes, por lo que reduce los efectos de los oxidantes, con lo cual puede evitarse el daño crónico del músculo (Leeuwenburgh 2001). Además, en varios estudios se ha valorado los efectos del ejercicio sobre el estrés oxidativo, en pruebas de esfuerzo al 70% del VO₂ max en sujetos moderadamente entrenados, a partir de mejoras de los mecanismos antioxidantes con los que se neutraliza el aumento de formación de radicales libres derivado del esfuerzo.

Una de las causas por las que se ve alterada esta composición de la membrana puede ser el ataque a los lípidos realizado por estos radicales libres dando lugar a LPO. El estado conocido como estrés oxidativo, es un proceso de autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares que se ve iniciado por una gran variedad de radicales libres (García, 1997). La consecuencia de esta LPO es el aumento de la rigidez de dicha membrana, así como la formación de metabolitos como el (MDA y 4 HDA. Si lo que se ve dañado por estos radicales libres son las proteínas la consecuencia es la aparición de restos carbonilo (PC). Por ello el objetivo de este estudio es analizar el efecto de el ejercicio físico agudo y de la duración del entrenamiento sobre la fluidez de la membrana muscular, sarcolema, en ratas Wistar.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

La investigación se realizó en rata de raza Wistar macho, para evitar las variaciones hormonales de las hembras, con pesos comprendidos entre 200-225 g. Los animales permanecieron estabulados en un ambiente controlado (temperatura $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas).

Los animales se dividieron en 5 grupos: Grupo 1: 10 ratas Wistar macho que sirvieron de control. No se le realiza ningún tipo de entrenamiento; Grupo 2: 10 ratas Wistar macho que realizaron un ejercicio agudo, tras el cual se realizó el sacrificio ;Grupo 3: 10 ratas Wistar macho que realizaron un entrenamiento durante un periodo de una semana. El sacrificio se realizó al día siguiente del último entrenamiento y en reposo.;Grupo 4: 10 ratas Wistar macho que realizaron un entrenamiento durante un periodo de un mes. El sacrificio se realizó al día siguiente del último entrenamiento y en reposo.;Grupo 5: 9 ratas Wistar macho que realizaron un entrenamiento durante un periodo de tres meses. El sacrificio se realizó al día siguiente del último entrenamiento y en reposo.

Todos los experimentos se realizaron cumpliendo estrictamente la normativa vigente europea (Directiva 86/609/CEE), española (Real Decreto 1201/2005) y autonómica (Ley 11/2003) para el uso de animales de experimentación.

El sacrificio de los animales se realizó por decapitación y se extrajo el tejido muscular.

Para evitar la influencia del ritmo circadiano la extracción de tejido se realizó entre las 10:00 y las 11:00 a.m.

2.2 PRUEBAS DE ESFUERZO

Todas las pruebas se realizaron en el periodo de tiempo comprendido entre las 8h y las 11h.

Determinación de VO₂ máximo

Antes de someter a las ratas a pruebas de esfuerzo, fue necesario determinar previamente su VO₂ máximo inicial. Para ello, se realizó una prueba de esfuerzo en rampa, utilizando un tapiz rodante con 25° de inclinación a una velocidad inicial de 15 cm/s. Tras un calentamiento de 15 minutos, se efectuó un incremento de la velocidad del tapiz de 0,03 cm/s cada 2 minutos.

Ejercicio agudo

Se sometieron las ratas al mismo protocolo de esfuerzo que el utilizado para la determinación de VO₂ máximo. Y se realiza la prueba hasta el agotamiento.

Entrenamiento

Los animales realizaron ejercicio durante 1 hora al día y 5 días a la semana durante un periodo de una semana, un mes o un trimestre. Realizaron un ejercicio de calentamiento de 20 minutos (40-50% del VO₂max), y a continuación fueron sometidas a dos cargas de trabajo alternas: 8 minutos de ejercicio submáximo al 85-90% del VO₂max y 2 minutos de ejercicio moderado al 50-60% del mismo. Figura 4 y figura 5.

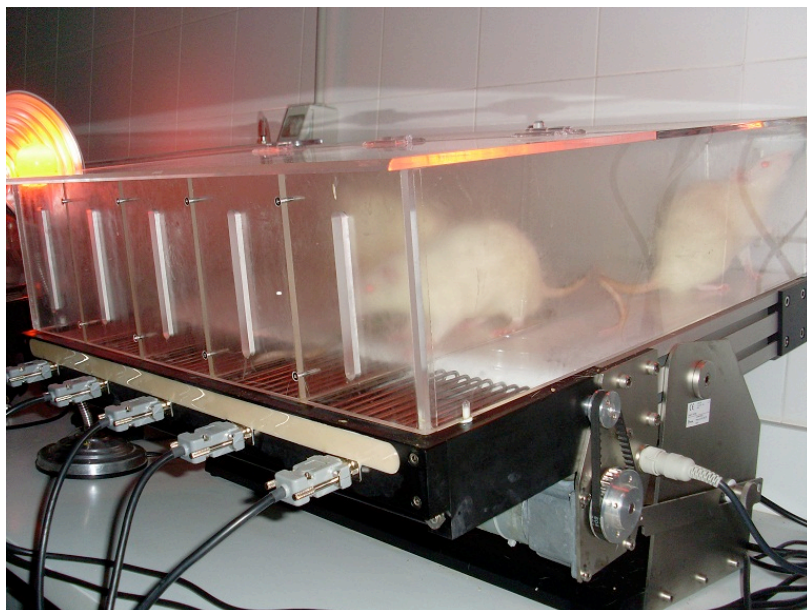


Figura 4: Entrenamiento de ratas.

2.3 MATERIAL



Figura 5: Equipo de entrenamiento.

- Tapiz rodante para rata de una calle modelo LE8700 (figura 7) y cinco calles modelo LE8710R de Panlab®.(figura 6).

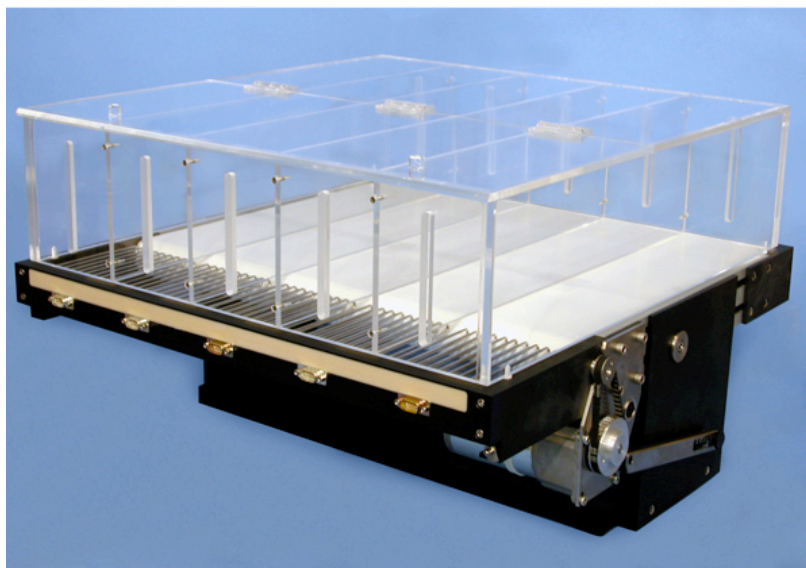


Figura 6: Tapiz rodante de cinco calles modelo LE8710R de Panlab®

- Unidad de control para treadmill de cinco calles de Panlab®.
- Unidad de control para treadmill de una calle de Panlab®

- Equipo de una calle treadmill control para rata LE8700de Panlab®.
- Gas Analyzer LE 405 de Panlab®.
- Agitadores: Vórtex Velp Scientifica® zx3.
- Balanzas de precisión Cobos® CBH-300J y A-220 CB.
- Baño termostatzado con agitación Bunsen® BTG-1.
- Centrífuga Beckman® Avanti 30™.
- Espectrofotómetro Beckman® DU800 con cubetas de plástico desechables para medir en el rango visible y cubetas de cuarzo para medir en el rango ultravioleta.
- Sistemas de agua destilada de Millipore® MilliRX y MilliQ.
- Máquina preparadora de escamas de hielo.
- Tris[hidro metil]aminometano (TRIS) (Sigma-Aldrich®, T-1503)



Figura 7: Tapiz rodante para rata de una calle modelo LE8700

- Bala de gas comprimido con CO₂ (5%), O₂ (16%) y N₂ (Balanceado) de Praxair España S.L.
- Bala de O₂ comprimido de Praxair España S.L.
- Homogenizador Ultra-turrax Janke & Kunkel® T25.
- Dos juegos de pipetas de precisión Gilson®: P-20, P-200, P-1000 y P-5000.
- pHmetro Crison® micro pH 2001 con sonda de temperatura.

- Espectroscopio de fluorescencia Perkin-Elmer LS-55 equipado con polarizadores y cubetas de cuarzo, así como un baño recirculador Selecta para mantener la temperatura constante $22 \pm 0,1$ °C y un accesorio de microagitación de la muestra presente en la cubeta.

- HCl 37% (Panreac®, 131020)
- Tetrahidrofurano (Sigma-Aldrich, 27038-5)
- 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-p-tolueno-sulfonato (TMA-DPH) (Molecular Probes®, T-204)
- Albúmina bovina (Sigma-Aldrich®, A-7848)
- Reactivo de Bradford (Bio-rad®, 500-0006)

2.4 AISLAMIENTO DE LOS SARCOLEMAS Y MITOCONDRIAS.

Previa a la determinación de la fluidez en sarcolema es necesario el aislamiento del mismo en la muestra de tejido muscular de la rata Wistar. Para ello, se pesaron 400 mg de tejido muscular, se trocearon con bisturí sobre placa de petri en hielo y se introdujeron en el homogeneizador de vidrio añadiendo 7 ml de HEPES 20mM KCl 140 mM pH=7,4 siempre en hielo para evitar la degradación enzimática. El homogeneizado se transfirió a un tubo de centrifuga para realizar el aislamiento de las membranas celulares.

Las membranas celulares se aislaron siguiendo la metodología descrita por Escames y cols. Con ligeras modificaciones (Escames y cols., 2001; Millán-Plano y cols., 2003). Este método consiste en la centrifugación diferencial. En primer lugar se centrifugó el homogeneizado a 1000 xg durante 10 min a 4°C para eliminar los restos de tejido no homogeneizado, los núcleos grandes y otros detritos celulares. A continuación el sobrenadante se centrifugó a 50.000 xg durante 20 min a 4°C. El precipitado, que contenía las membranas y las mitocondrias, se resuspensión en tampón HEPES 20mM KCl 140mM pH=7.4 y se volvió a centrifugar a 10.000 xg durante 15 min a 4°C. A partir del sobrenadante se obtuvieron las membranas y a partir del pellet las mitocondrias:

Una vez recogido el sobrenadante y la capa flogística, que contenía las membranas celulares, se centrifugó a 50.000 xg durante 20min a 4°C. Esta velocidad de centrifugación conllevó la precipitación de las membranas que finalmente se resuspendieron en tampón tris-HCl 20mM pH 7.4 en una dilución 1:2. Las muestras se guardaron a -80°C hasta la medición de la fluidez.

El pellet se resuspendió con 7 ml de HEPES y se centrifugó a 10000g, 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en TRIS 50 mM en una dilución 1:2. Las muestras se guardaron a -80°C hasta la medición de la fluidez.

2.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

La concentración de proteínas se calculó con objeto de establecer unos criterios uniformes en la valoración de la fluidez de la membrana. Se determinaron por el método de Bradford (1976). Este procedimiento analítico se basa en la adición de un colorante ácido, el reactivo de Bradford, a la suspensión de proteína problema y a continuación la medición en un espectrofotómetro a 595 nm. El reactivo de Bradford es una disolución que contiene un colorante para proteínas en ácido fosfórico y metanol.

Los resultados de absorbancia obtenidos para las muestras se compararon con una curva estándar de albúmina bovina sérica, y a continuación se realizó el cálculo de las concentraciones de proteínas mediante el programa Assay 4.0 (Biosoft®), teniendo en cuenta la dilución inicial de las muestras. Los resultados se expresaron en mg/mL. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.6 MEDICIÓN DE LA FLUIDEZ EN LAS MEMBRANAS CELULARES

Se midió la fluidez utilizando TMA-DPH como reactivo fluorescente, ya que es un marcador que se intercala entre los fosfolípidos de la membrana, reflejando de esta forma indirecta sus movimientos. Su incorporación a la membrana sarcolema y la determinación de la MF se realizó de acuerdo al protocolo de Yu y cols. Las membranas (0,5 mg proteína/mL) fueron resuspendidas en TRIS (3 mL de volumen final) a lo que se añadió el TMA-DPH (66,7 nM) (Figura 8). Después de agitar en un vórtex durante 1 minuto, la preparación se incubó a 37° C durante 30 minutos. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS-55, equipado con un baño de agua circulatorio para mantener la temperatura constante a $22 \pm 0,1^\circ \text{C}$. Se utilizaron longitudes de onda de 360 nm y 430 nm para la excitación y emisión respectivamente. La intensidad de emisión de la luz polarizada verticalmente se detectó por un analizador orientado en paralelo (IVV) o perpendicularmente (IVH) al plano de excitación. Se utilizó un factor de corrección del sistema óptico, G. La polarización (P) se calculó por la ecuación siguiente:

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

Existe una relación inversa entre la MF y la polarización (Yu 1992) de este modo, la fluidez de membrana se expresó como $1/P$, y se calculó a partir de determinaciones por triplicado.

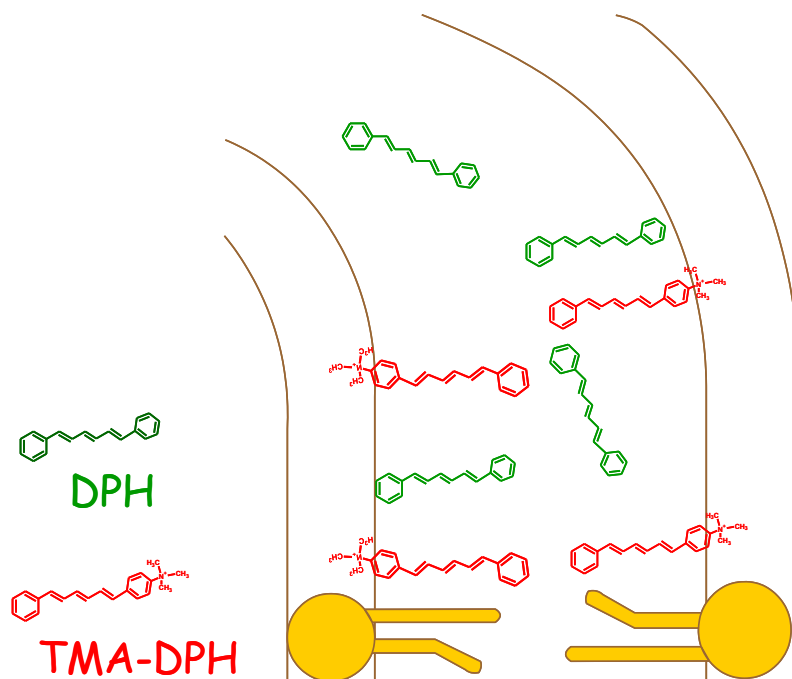


Figura 8. Localización de diversos marcadores utilizados en la valoración de la fluidez de una membrana. En esta investigación utilizamos el TMA-DPH. Esta molécula tiene como ventaja respecto al DPH su carácter anfipático, lo que permite que se oriente en la membrana paralela a los fosfolípidos con el resto TMA en las regiones hidrofílicas de la membrana.

2.7 MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

El tratamiento estadístico se realizó con el programa informático SPSS 13.0. Las variables cuantitativas se definieron mediante dos parámetros, la media aritmética, como medida de la tendencia central, y el error estándar, como una medida de la dispersión. Por ello, los resultados son expresados siempre como media aritmética \pm error estándar. En cada grupo de estudio se comprobó la hipótesis de normalidad de las distribuciones mediante el test de Kolmogorv-Smirnov. Para la comparación estadística entre las medias de los grupos se realizó un estudio inferencial para comprobar si las diferencias entre las medias de los grupos eran estadísticamente significativas, lo que se logró aplicando el test de la t de Student para datos desapareados. El valor de significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Sarcolema:

En comparación con el grupo control se aprecia una acusada disminución de la fluidez de membrana en el caso del ejercicio agudo, mientras que para el entrenamiento de una semana no hay diferencias significativas de la fluidez, en el caso del entrenamiento de un mes y un trimestre se observa una disminución ligeramente menor que para el entrenamiento agudo pero significativa y en valor medio de la misma cuantía.

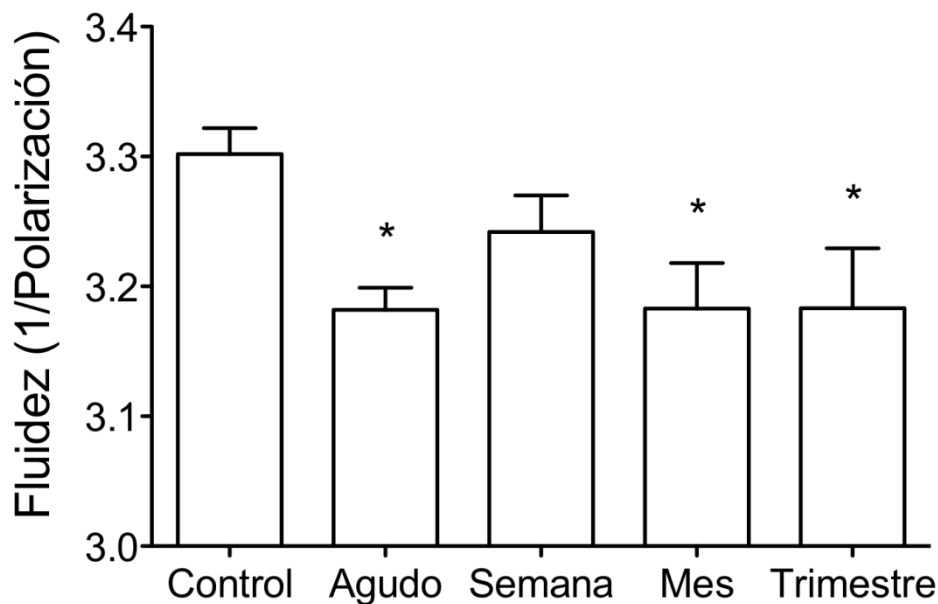


Figura 9: Fluidez de membrana (1/Polarización) de células del músculo esquelético para los grupos agudo, de control y entrenamiento semanal y mensual $n=10$ y el grupo trimestral $n=9$. Los valores indican la medición mas el error estándar para cada grupo estudiado: Control y entrenamientos de una semana, un mes o un trimestre. (*) Significa que hay diferencias significativas $p<0.05$ respecto a la población control.

3.2 Mitocondria:

En comparación con el grupo control se aprecia una disminución de la fluidez de membrana en el caso del ejercicio agudo, del entrenamiento de una semana, del caso del entrenamiento de un mes y un trimestre. Siendo muy acusada en el caso del entrenamiento de un mes. Y siendo de menor valor en el caso del entrenamiento de tres meses.

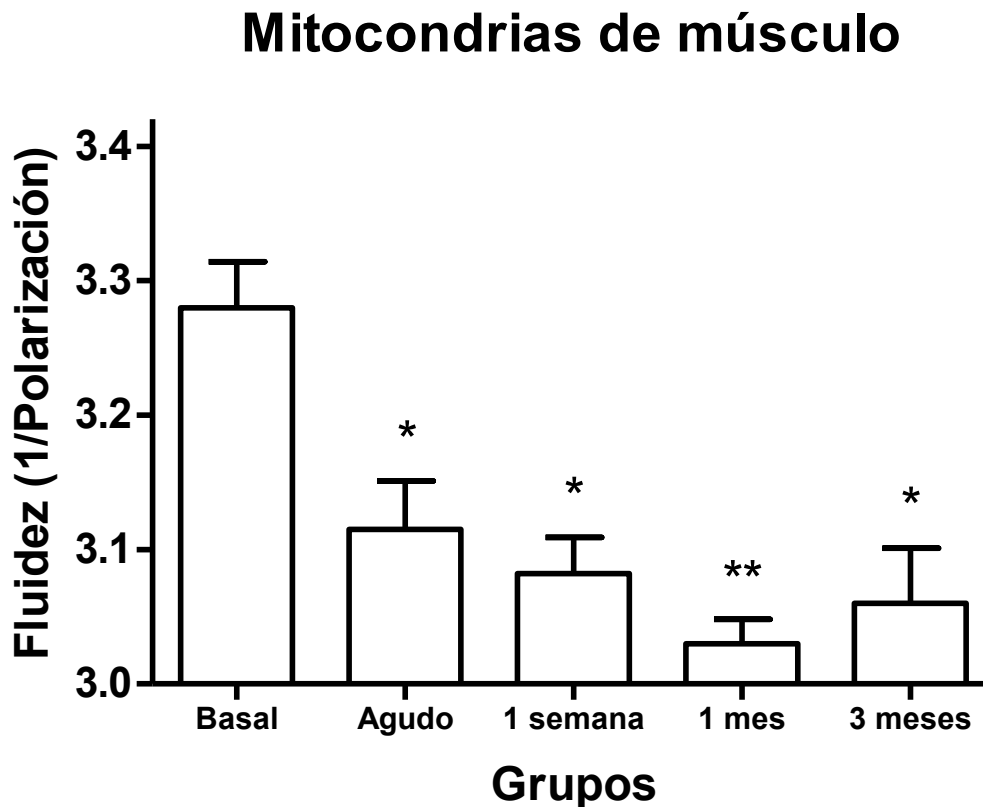


Figura 10: Fluidez de membrana (1/Polarización) de mitocondria del músculo esquelético para los grupos agudo, de control y entrenamiento semanal y mensual n=10 y el grupo trimestral n=9. Los valores indican la medición mas el error estándar para cada grupo estudiado: Control y entrenamientos de una semana, un mes o un trimestre.(*) Significa que hay diferencias significativas $p < 0.05$ respecto a la población control. (**) Significa que hay diferencias significativas $p < 0.05$ respecto a la población agudo.

4. DISCUSIÓN

El ejercicio físico está claramente relacionado con un aumento del consumo de oxígeno en todo el cuerpo (Cazzorla, 2003). Por otra parte, como consecuencia de este aumento del consumo de oxígeno hay un aumento potencial del estrés oxidativo (Leeuwenburgh, 2001; Jackson, 2005; McArdle, 2005; Traber, 2006; Bloomer, 2006), debido a la mayor producción de radicales libres en las mitocondrias celulares (Child, 1998). La peroxidación lipídica y proteica es la expresión de este estrés en las membranas celulares (García, 1997), como consecuencia se produce una alteración de los movimientos de los fosfolípidos, ahora oxidados, que provoca una rigidez en su fluidez.

En la fluidez de las membranas de las células musculares, se puede observar un descenso respecto al grupo control, significativo estadísticamente, después de un entrenamiento de tipo agudo, debido posiblemente al aumento del estrés oxidativo generado en ellas. La rigidez de la membrana es mayor tras la prueba aguda y también se produce un aumento de rigidez de la membrana significativo estadísticamente en los entrenamientos de tipo mensual y trimestral, coincidiendo en media por lo que se podría deducir que el estrés oxidativo generado en las células musculares medido como rigidez en la membrana permanece estable en entrenamientos a partir de un mes.

Teniendo en cuenta que gran parte de los radicales libres son capaces de difundir a través de la membrana, los radicales libres producidos durante el esfuerzo reaccionarían con los fosfolípidos de la membrana, alterando su composición, agrupación y distribución (Cazzorla, 2003). Es por esto que aparece mayor rigidez en las membranas tras el ejercicio agudo, lo que condiciona el paso de sustancias a través de ella y la deformabilidad de la célula, características necesarias para realizar su función de transporte por todo el cuerpo.

En resumen y para tener una visión global, hemos comprobado que tras el ejercicio físico agudo, las membranas musculares se alteran con reducción de su fluidez y movilidad de sus fosfolípidos. Es previsible que en respuesta al estímulo de estrés oxidativo, nuestro organismo reaccione aumentando la actividad antioxidante del plasma, por ello se tendrían que cuantificar en estas muestras metabolitos del estrés oxidativo como MDA+4-HDA, restos carbonilos proteicos y actividad total antioxidante, así como la actividad de enzimas antioxidantes.

5. CONCLUSIONES

PRIMERA: En ratas Wistar, se produce un descenso tanto de la fluidez de membrana muscular como de la membrana mitocondrial de músculo, atribuible a daño oxidativo, tras la realización de ejercicio físico.

SEGUNDA: En el caso del sarcolema se produce un descenso mucho menos acusado de la fluidez de membrana que en el caso de la mitocondria. Probablemente esto se deba a que en la mitocondria la producción de especies reactivas de oxígeno es mucho mayor y por tanto el daño oxidativo también lo es.

TERCERA: En el caso de membrana muscular en el entrenamiento de una semana la disminución de fluidez no fue significativa frente al control, en los grupos con entrenamiento de uno y tres meses la rigidez de membrana fue semejante entre sí y con el ejercicio agudo. Sin embargo para el caso mitocondrial se produce un descenso en la fluidez de membrana en todos los casos, para el entrenamiento agudo y de un mes muy acusado y de menor cuantía para el caso de entrenamiento de tres meses.

CUARTA: Proponemos confirmar estos resultados valorando el efecto del ejercicio físico con otros indicadores de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes, realizando estos ensayos en diversos tejidos.

6. BIBLIOGRAFIA

ACSM, ACSM'S resource manual for guidelines for exercise testing and prescription; Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001

Atkinson G, Holder A, Robertson C, Gant N, Drust B, Reilly T, Waterhouse J. Effects of melatonin on the thermoregulatory responses to intermittent exercise. *Journal of Pineal Research* 39: 353-359, 2005.

Blair S. N, Kohl H. W, Barlow C. E.; Paffenbarger, R. S, Gibbons L. W, Macera C. A, Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA*, 273, 1093-1098, 1995

(a)Bloomer R, Davis P, Consitt L ,Wideman L. Plasma Protein Carbonyl Response to Increasing Exercise Duration in Aerobically Trained Men and Women. *Physiology & Biochemistry* 28: 21-25, 2006.

(b)Bloomer R. J, Falvo, M. J, Fry A. C, Schilling B. K, Smith, W. A, Moore, C. A.,
Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Medicine & Science in Sports & Exercise.*,38, 1436-1442.2006

Bloomer R. J, Davis P. G, Consitt L. A, Wideman, L., Plasma protein carbonyl response to increasing exercise duration in aerobically trained men and women. *International Journal Sports Medicine*, 28, (1), 21-5. 2007

Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal.*;128(3):617–630. 1972

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.

Cazzorla R, Russo-Volpe S, Cervato G and Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *European Journal of Clinical Investigation* 33: 924-930, 2003.

Child R, Wilkinson D, Fallowfield J and Donnelly A. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 30: 1603-1607, 1998.

De Moffarts B, Portier K, Kirschvink N, Coudert J, Fellmann N, van Erck E, Letellier C, Motta C, Pincemail J, Art T, Lekeux P, Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *Veterinary Journal*, 174, (1), 113-21, 2007.

Durstine, J. L, Haskell, W L,, Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins. *Medicine & Science in Sports & Exercise Rev*, 22, 477-521, 1994.

Escames G, Macías M, León J, García j, Khaldy H, Martín M, Vives F y Acuña-Castroviejo D. Calcium-dependent effects of melatonin inhibition of glutamatergic response in rat striatum. *Journal Neuroendocrinology*, 13, 459-466. (2001)

García JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS and Muñoz-Hoyos A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Letters* 48: 297-300, 1997.

Gómez-Trullén EM, Leal L, Millán-Plano S, Albendea CD, Fuentes-Broto L, Martínez-Ballarín E, García JJ and Escanero JF. Efectos del ejercicio físico submáximo en la actividad antioxidante del suero. *Diagnostico in vitro* 3: 2005.

Gutteridge JM Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*. Dec;41(12 Pt 2):1819-28. Review. 1995.

Guyton, A. C., Hall, J. E. Tratado de fisiología médica. Ed McGraw – Hill, 2001.

Heron DS, Shinitzky M, Hershkowitz M, Samuel D. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes *Proceedings National Academy of Sciences U S A.*;77 :7463-7467,1980.

Jackson M. Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 360: 2285-2291, 2005.

Jackson MJ, Pye D, Palomero J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology.*102(4):1664–1670. 2007

Lee I M, Hsieh, C C, Paffenbarger R S. Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study. *JAMA*, 273, 1179-1184,1995.

Leeuwenburgh C and Heinecke J. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Current Medicinal Chemistry* 8: 829-838, 2001.

Liu J, Yeo, H C, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger S J, Chyu D W, Brooks G A, Ames B N, Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal of Applied Physiology* , 89, (1), 21-8 ,2000.

McArdle F, Pattwell D, Vasilaki A, McArdle A and Jackson M. Intracellular generation of reactive oxygen species by contracting skeletal muscle cells. *Free radical biology & medicine* 39: 651-657, 2005.

Metin G, Atukeren P, Alturfan A A, Gulyasar T, Kaya M, Gumustas M. K, Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals in young male footballers. *Yonsei Medical Journal* 44, (6), 979-86 2003.

Senturk, U K, Yalcin O, Gunduz, F, Kuru O, Meiselman H J, Baskurt O K, Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects. *J Appl Physiol*, 98, (4), 1272-1279,2005.

Shaper A G, Wannamethee G, Weatherall R, Physical activity and ischaemic heart disease in middle-aged British men. *British Heart Journal*, 66, (5), 384-94,1991.

Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*.;175:720–731, 1972.

Traber M. Relationship of vitamin E metabolism and oxidation in exercising human subjects. *The British Journal of Nutrition* 96: 34-37, 2006.

Urso M. L, Clarkson, P. M., Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189, (1-2), 41-54,2003,.

Wilmore J H, Costill D L. Fisiología del esfuerzo y del deporte; Ed. Paidotribo, 1998.

Yu BP, Suescun EA, Yang SY. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A₂: Modulation by dietary restriction. *Mechanisms of Ageing. Development*. 65, 17-33, 1992.