

Eduardo Piedrafita Trigo

# Efectos del ejercicio físico en la fluidez de membranas celulares y mitocondriales: su relación con el estrés oxidativo

Departamento  
Farmacología y Fisiología

Director/es

García García, José Joaquín  
López Pingarrón, Laura

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



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

EFFECTOS DEL EJERCICIO FÍSICO EN LA FLUIDEZ  
DE MEMBRANAS CELULARES Y  
MITOCONDRIALES: SU RELACIÓN CON EL  
ESTRÉS OXIDATIVO

Autor

Eduardo Piedrafita Trigo

Director/es

García García, José Joaquín  
López Pingarrón, Laura

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Farmacología y Fisiología

2013





**Universidad** de Zaragoza

**EFFECTOS DEL EJERCICIO FÍSICO EN LA  
FLUIDEZ DE MEMBRANAS CELULARES Y  
MITOCONDRIALES. SU RELACIÓN CON EL  
ESTRÉS OXIDATIVO.**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR  
**D. Eduardo Piedrafita Trigo**  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EUROPEO  
**Zaragoza, 2013**





**JOSÉ JOAQUÍN GARCÍA GARCÍA**, Catedrático del Área de Fisiología del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza, y

**LAURA LÓPEZ PINGARRÓN**, Profesora Asociada del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Universidad de Zaragoza,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo de investigación titulado **“Efectos del ejercicio físico en la fluidez de membranas celulares y mitocondriales. Su relación con el estrés oxidativo”**, realizado por D. Eduardo Piedrafita Trigo en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección, responde perfectamente al Proyecto de Tesis presentado con el mismo título en el Departamento de Farmacología y Fisiología. Por tanto, valoramos el informe de esta Tesis como FAVORABLE, al reunir todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa bajo la modalidad de Mención de Doctor Europeo.

Zaragoza, a 19 de Diciembre de 2012

José Joaquín García García

Laura López Pingarrón



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



**“Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF)” (RD06/0013/1017).**  
Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa. Ministerio de Ciencia e Innovación.



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

Y las siguientes becas de investigación:



**“Beca de formación y contratación de personal investigador”** para Eduardo Piedrafita Trigo (B091/2009).  
Gobierno de Aragón.



**“Programa Europa XXI de Estancias de Investigación”**  
(853.941798/98600016-2). Convocatorias 2010 y 2012. Caja de Ahorros de la Inmaculada y Gobierno de Aragón.





# Agradecimientos

---

Es curioso comprobar cómo empiezan algunos viajes y cómo se van desarrollando con el tiempo. Algunas veces, uno organiza su equipaje para estar lo mejor preparado posible ante un destino conocido donde se pretende llegar. Otras, se opta por la improvisación y la espontaneidad, y parte con lo mínimo necesario para afrontar las sorpresas que le pueda deparar el viaje. Y existen otras en las que, comenzando un viaje planificado, ve que en él tienen lugar una serie de sucesos inesperados, los cuales le llevan a un destino diferente al que se había planteado inicialmente pero que, una vez allí, ve que es bueno, que merece la pena. Y que quiere quedarse. Éste ha sido mi viaje. Mi tesis.

Porque esta aventura comenzó en el curso académico 2006-07 con una beca de colaboración en el último año de mi licenciatura en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Quería conocer de primera mano el contexto más científico en el que pudiera desarrollarse mi área de estudio, así como introducirme en el campo de la investigación y ver qué aplicaciones podría tener en el ámbito físico-deportivo. El grupo de investigación consolidado *Fisiología del Envejecimiento y del Estrés Oxidativo*, dirigido por el profesor Joaquín García y cuyo trabajo se desarrolla en los laboratorios del profesor Enrique Martínez Ballarín, en el Área de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, me dio la oportunidad. Y no sólo para colaborar con ellos y satisfacer mis inquietudes, sino también para iniciar una nueva etapa en mi vida desarrollando una carrera científico-docente en la Universidad de Zaragoza, idea que ni siquiera me había planteado cuando comencé este “viaje”, y que se facilitó, además, gracias a la concesión de una beca predoctoral de investigación por parte del Gobierno de Aragón.

Así pues, éste es el resultado de una cadena de decisiones, de horas de trabajo dentro y fuera del laboratorio y de dedicación, así como de aprendizaje, esfuerzo y mucha ilusión. Este tren hace una pequeña parada en esta estación, mi tesis doctoral, y para llegar a ella han intervenido muchas personas e instituciones a las que quisiera agradecer su apoyo, interés, consejo, ayuda y amistad:

Al profesor Joaquín García por abrirme las puertas a su grupo de investigación y ser la primera persona que puso en mi cabeza la idea de realizar la tesis doctoral, inculcándome el deseo de investigar y facilitando la realización de este proyecto a través de sus conocimientos, recursos y, sobre todo, confianza, para poder llevarlo a cabo. A la profesora Laura López Pingarrón, que nos hemos conocido durante estos años y gracias a su trabajo ha logrado

evolucionar de compañera de doctorado a directora de mi tesis, de lo cual he sido testigo y estoy muy satisfecho. A los dos, muchas gracias por brindarme la oportunidad de presentar esta tesis bajo vuestra dirección. Quisiera extender también este agradecimiento al profesor Enrique Martínez Ballarín por haberme permitido trabajar en su laboratorio, además de interesarse por mi evolución y aportarme consejos desde su experiencia.

Al Gobierno de Aragón, la Universidad de Zaragoza, la CAI y la RETICEF, por su ayuda institucional y económica, que ha permitido llevar a buen puerto esta tesis.

A mis compañeros del grupo de “Fisiología del Envejecimiento y del Estrés Oxidativo”, con los que he pasado horas en el laboratorio y he aprendido mucho durante estos años.

A los “otros compañeros” investigadores: Marta, Mapi, Goretti, Yosu, Eva, Sonia, Conchi, María, Laura, Pilar, Carmen, la otra María, Rebeca, Espe y Álvaro, los que están y lo que se fueron, por esos ratos de charlas, cafés y comidas.

Al profesor Darío Acuña Castroviejo y a la profesora Germaine Escames, quienes posibilitaron la realización de mi primera estancia de investigación en la Universidad de Granada, donde descubrí nuevas metodologías y me sentí como uno más gracias también a Ana, Araceli, Carmen, Santos, José Carlos, Alberto, Laura, Francis y Eric.

Thanks to professor Russel J. Reiter, the greatest expert about melatonin in the world, who accepted take in me for three months in his laboratory at the University of Texas Health Science Center in San Antonio. This was a sincere honor for me. Thanks to Dr. Tan and Dr. Manchester, they were very kind with me and they introduced me in USA culture.

Thanks to professor Mark Willems, who allowed me to be with his research group and he made easy my stay at the University of Chichester in England, where I learnt new techniques and methods about exercise physiology. This meant the chance to obtain European Doctoral degree. My gratitude to James and Matthew, they allowed my participation in their investigations.

A mis amigos, mi pandilla, esa familia que elegimos a lo largo de la vida: Pradas, David, Sagan, Lecha, Cebo, Igor, Oso, Will, Camacho, Carlos, Moli, Danilo. Para mí es un auténtico orgullo estar rodeado de gente como vosotros, y que nuestra amistad perdure después de tantos y tantos años para que podamos ver juntos cómo hemos crecido, cambiado y aprendido. Gracias por vuestros ánimos, por esos raticos de felicidad que siempre sacamos y por ser personas buenas y sanas, que tal y como está el panorama es de agradecer.

A mis compañeros de promoción en la licenciatura y amigos. A Óscar, compañero de fatigas, sobre todo estos dos últimos años en los que hemos compartido muchas vivencias. Gracias por tu apoyo y confianza, y por todos los cables que me has ido echando. A Paula y Héctor, que me habéis dado mucho ánimo en los buenos (y en los no tan buenos) momentos. Gracias por vuestra amistad y por esos momentos compartidos. Héctor, el siguiente eres tú.

A Martina, Ramón y Blanca: imposible haber podido andar este camino sin vosotros. Es muy difícil plasmar en palabras el agradecimiento que siento por todo lo que habéis hecho y hacéis por mí. Me siento en deuda con vosotros, sólo espero seguir compartiendo experiencias y vuestra amistad durante muchos años. Aúpa Híjar.

A los amigos del Gimnasio Imperial por esos buenos ratos que nos han servido para entrenar y, sobre todo, conocernos, reírnos y relajarnos de la actividad diaria.

Y, por supuesto, a mi familia. A mis padres, José Manuel y Marisol, y a mi abuela, Manoli, por todo el amor, cariño y atención que me habéis transmitido no sólo estos años, sino a lo largo de toda mi vida; nunca me ha faltado nada, habéis luchado como jabatos y siempre habéis confiado en mí. Por la educación que me disteis, me dais y me seguiréis dando, espero, por muchos años. Por formarme en unos valores basados en la integridad, el respeto, la humildad, la responsabilidad (*“primero la obligación y después lo que gusta”*), la constancia y el esfuerzo en el trabajo (que, al final, es lo que verdaderamente conllevan a la satisfacción y al éxito personal), y en saber disfrutar de la vida, que son dos días y muchas veces lo olvidamos. Por todo ello, os estaré eternamente agradecido. Indudablemente, también a mis tíos (Pilar, Lourdes y Paco) y a mis primos (Mónica, Juan Luis, Carina, Javi, Jorge y Ale), por vuestro cariño e interés, y esas palabras de aliento y ánimo que me habéis transmitido todas y cada una de las veces que hemos hablado o logrado reunirnos.

Pero el tren no se detiene aquí, todavía tiene un largo camino por recorrer porque esto es sólo la primera parte del viaje, y aún quedan experiencias nuevas por vivir. *“Próxima parada...”*.



***A mi familia y amigos.  
Al fin llegamos a la meta.***



***“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas.”***

Santiago Ramón y Cajal

***“El deporte no forja el carácter. Lo pone de manifiesto.”***

Heywood Hale Broun

***“No puedes medir tu éxito si nunca has fallado.”***

Steffi Graff

***“No se fracasa hasta que no se deja de intentar.”***

Florence Griffith

***“Nadie te puede obligar a hacer más de lo que puedes. Pero si puedes, da lo mejor de ti.”***

Mis padres





# ABREVIATURAS



4-HDA: 4-hidroxiálquenos  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADP: adenosín difosfato  
AP-1: proteína activadora 1  
ATP: adenosín trifosfato  
BSA: albúmina sérica bovina  
Ca<sup>2+</sup>: ion calcio  
Cat: catalasa  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono  
●CO<sub>3</sub><sup>-</sup>: radical carbonato  
Cu, Zn SOD: superóxido dismutasa de cobre y zinc  
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina  
e<sup>-</sup>: electrón  
ecSOD: superóxido dismutasa extracelular  
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial  
ERNs: especies reactivas dependientes del nitrógeno  
EROs: especies reactivas dependientes del oxígeno  
FADH<sub>2</sub>: flavín adenín-dinucleótido  
FC: frecuencia cardiaca  
GPx: glutatión peroxidasa  
GR: glutatión reductasa  
GSH: glutatión reducido  
GSSG: glutatión oxidado  
H<sup>+</sup>: hidrogenión  
Hb: hemoglobina  
HCl: ácido clorhídrico  
HClO: ácido hipocloroso  
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico  
H<sub>2</sub>O: agua  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
HO<sub>2</sub>●: radical perhidroxilo

HONOO: ácido peroxinitroso  
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible  
KCl: cloruro potásico  
LH: lípido intacto  
lpm: latidos por minuto  
LPO: peroxidación lipídica  
MDA: malonildialdehído  
MnSOD: superóxido dismutasa de manganeso  
mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial  
NaCl: cloruro sódico  
NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenín-dinucleótido oxidada  
NADH: nicotinamida adenín-dinucleótido reducida  
NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato oxidada  
NADPH: nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducida  
NF-κB: factor nuclear κB  
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal  
●NO: radical óxido nítrico  
NO<sub>2</sub>: dióxido de nitrógeno  
●NO<sub>2</sub>: radical dióxido de nitrógeno  
NOS: óxido nítrico sintasa  
O<sub>2</sub>: oxígeno molecular  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxígeno singlete  
●O<sub>2</sub><sup>-</sup>: radical superóxido  
OH<sup>-</sup>: anión hidroxilo  
●OH: radical hidroxilo  
ONOO<sup>-</sup>: anión peroxinitrito  
ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>: ion nitrosoperoxicarbonato  
P: polarización  
PA: presión arterial

PCO<sub>2</sub>: presión parcial de dióxido de carbono  
PO<sub>2</sub>: presión parcial de oxígeno  
prot.: proteína  
Q: gasto cardiaco  
R●: radical alquilo  
RO●: radical alcoxilo  
ROO●: radical peroxilo  
ROOH: peróxido lipídico  
RS●: radical libre a partir de átomos de azufre  
SOD: superóxido dismutasa

TBARS: sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico  
TCA: ácido tricloroacético  
THF: tetrahidrofurano  
TMA-DPH: 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-*p*-tolueno sulfonato  
TRIS: tris(hidroximetil)aminometano  
UV: ultravioleta  
v<sub>f</sub>: velocidad final  
VO<sub>2</sub>: consumo de oxígeno  
VO<sub>2</sub>max: consumo máximo de oxígeno  
Vs: volumen sistólico

# ÍNDICE



	<u>Pág.</u>
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
<b>1.1. Radicales libres</b> .....	19
1.1.1. <i>Concepto</i> .....	19
1.1.2. <i>Tipos</i> .....	20
1.1.2.1. Especies reactivas derivadas del oxígeno .....	20
1.1.2.2. Especies reactivas dependientes del nitrógeno .....	23
1.1.2.3. Radicales de átomos derivados del carbono .....	25
1.1.2.4. Radicales de átomos derivados del azufre .....	25
1.1.3. <i>Formación en los seres vivos</i> .....	25
1.1.3.1. Fuentes endógenas de radicales libres .....	25
1.1.3.2. Fuentes exógenas de radicales libres .....	29
1.1.4. <i>Mecanismos de protección</i> .....	29
1.1.4.1. Antioxidantes .....	30
1.1.4.2. Sistemas reparadores .....	31
1.1.5. <i>Estrés y daño oxidativo</i> .....	32
1.1.5.1. Peroxidación lipídica .....	32
1.1.5.2. Daño oxidativo a las proteínas .....	34
1.1.5.3. Daño oxidativo al ADN .....	35
1.1.5.4. Daño oxidativo a los glúcidos .....	36
1.1.5.5. Efecto de los radicales libres en las membranas .....	37
<b>1.2. Ejercicio físico</b> .....	40
1.2.1. <i>Actividad física y salud</i> .....	40
1.2.2. <i>Fisiología del ejercicio</i> .....	41
1.2.2.1. Clasificación de los ejercicios .....	41
1.2.2.2. Fases del ejercicio .....	42
1.2.2.3. Adaptaciones al ejercicio .....	44



1.2.3. Actividad física, radicales libres y antioxidantes .....	49
1.2.3.1. Fuentes de radicales libres durante el ejercicio físico .....	50
1.2.3.2. Funciones de los radicales libres en el ejercicio .....	54
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>57</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>3. AIMS .....</b>	<b>65</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1. Animales .....</b>	<b>71</b>
<b>4.2. Materiales .....</b>	<b>72</b>
4.2.1. Material de laboratorio .....	72
4.2.2. Reactivos químicos .....	73
<b>4.3. Diseño experimental .....</b>	<b>75</b>
4.3.1. Grupos de estudio .....	75
4.3.2. Equipo ergométrico .....	75
4.3.3. Prueba de esfuerzo máximo (Protocolo ergométrico de ejercicio agudo) .....	77
4.3.4. Programas de entrenamiento .....	78
4.3.5. Procesamiento de muestras .....	80
<b>4.4. Métodos analíticos .....</b>	<b>81</b>
4.4.1. Aislamiento de membranas .....	81
4.4.1.1. Tejido muscular e hígado .....	81
4.4.1.2. Tejido nervioso .....	83
4.4.2. Valoración de la fluidez de membrana.....	85
4.4.3. Cuantificación del MDA + 4-HDA .....	87
4.4.4. Valoración de la carbonilación proteica .....	89
4.4.5. Determinación de la concentración de proteínas .....	91
<b>4.5. Tratamiento estadístico .....</b>	<b>93</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>95</b>
<b>5.1. Estudios ergométricos .....</b>	<b>97</b>
5.1.1. Pruebas de esfuerzo máximo .....	97
5.1.2. Programa de entrenamiento .....	98

<b>5.2. Estudio de la fluidez y los indicadores de lesión oxidativa en el músculo</b>	
<b>esquelético</b> .....	100
5.2.1. <i>Fluidez en la membrana celular</i> .....	100
5.2.2. <i>Fluidez en la mitocondria</i> .....	101
5.2.3. <i>Peroxidación lipídica</i> .....	102
5.2.4. <i>Carbonilación proteica</i> .....	103
<b>5.3. Fluidez, peroxidación lipídica y carbonilación proteica en el músculo</b>	
<b>cardiaco</b> .....	104
5.3.1. <i>Fluidez en la membrana celular</i> .....	104
5.3.2. <i>Fluidez en la mitocondria</i> .....	105
5.3.3. <i>Peroxidación lipídica</i> .....	106
5.3.4. <i>Carbonilación proteica</i> .....	107
<b>5.4. Niveles de fluidez de membrana e indicadores de lesión oxidativa</b>	
<b>hepáticos</b> .....	108
5.4.1. <i>Fluidez en la membrana celular</i> .....	108
5.4.2. <i>Fluidez en la mitocondria</i> .....	109
5.4.3. <i>Peroxidación lipídica</i> .....	110
5.4.4. <i>Carbonilación proteica</i> .....	111
<b>5.5. Efectos del ejercicio en la fluidez y oxidación en el tejido nervioso</b>	
<b>central</b> .....	112
5.5.1. <i>Fluidez en los sinaptosomas</i> .....	112
5.5.2. <i>Fluidez en la membrana mitocondrial</i> .....	113
5.5.3. <i>Peroxidación lipídica</i> .....	114
5.5.4. <i>Carbonilación proteica</i> .....	115
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	117
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	129
<b>7. CONCLUSIONS</b> .....	133
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	137



# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

---

<b>Tabla I:</b> Resumen de los principales antioxidantes enzimáticos biológicos .....	30
<b>Tabla II:</b> Principales antioxidantes no enzimáticos .....	31
<b>Tabla III:</b> Velocidad final alcanzada por cada rata en la prueba ergométrica máxima, y media calculada en cada grupo de ejercicio .....	97
<b>Tabla IV:</b> Carga de trabajo de los subgrupos de entrenamiento .....	99
<b>Figura 1:</b> Configuración electrónica de varias especies reactivas dependientes del oxígeno .....	20
<b>Figura 2:</b> Reducciones del oxígeno hasta formar agua .....	26
<b>Figura 3:</b> Reacciones principales de la peroxidación lipídica .....	34
<b>Figura 4:</b> Reacciones de los radicales libres con las proteínas .....	35
<b>Figura 5:</b> Modelo de mosaico fluido por el que se explica la estructura de las membranas celulares .....	37
<b>Figura 6:</b> Movimientos de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de una membrana celular .....	38
<b>Figura 7:</b> Concepto de salud como un estado cambiante dentro de un continuo .....	40
<b>Figura 8:</b> Fases de consumo de oxígeno durante el ejercicio .....	43
<b>Figura 9:</b> Relación entre gasto cardiaco, volumen sistólico de eyección y frecuencia cardiaca en latidos por minuto .....	45
<b>Figura 10:</b> Efecto del pH y de la temperatura en la curva de saturación de la hemoglobina ....	46
<b>Figura 11:</b> Principales fuentes de radicales libres y producción de EROs durante el ejercicio .....	52
<b>Figura 12:</b> Efectos de los radicales libres en la célula .....	55
<b>Figura 13:</b> Equipo ergométrico empleado en la habitación habilitada para los protocolos de ejercicio, en situación de luz natural y simulando la situación de oscuridad con el uso de luz roja .....	71
<b>Figura 14:</b> Equipo instrumental ergométrico utilizado en las pruebas de esfuerzo agudo .....	76
<b>Figura 15:</b> Ergómetro para rata de cinco calles utilizado para los entrenamientos de los animales .....	77
<b>Figura 16:</b> Protocolo de la prueba de esfuerzo máxima .....	78
<b>Figura 17:</b> Planificación del entrenamiento para los grupos de ratas 3, 4 y 5 .....	79
<b>Figura 18:</b> Protocolo de aislamiento de membranas a partir de músculo esquelético, cardiaco e hígado .....	82

<b>Figura 19:</b> Protocolo de aislamiento de membranas a partir de cerebro .....	84
<b>Figura 20:</b> Protocolo de medición de la polarización en las membranas .....	86
<b>Figura 21:</b> Protocolo de cuantificación de MDA + 4-HDA .....	88
<b>Figura 22:</b> Fundamento de la cuantificación de restos carbonilo en las proteínas .....	90
<b>Figura 23:</b> Protocolo de cuantificación de proteínas .....	92
<b>Figura 24:</b> Velocidades finales individuales en cada grupo .....	98
<b>Figura 25:</b> Cargas de trabajo (35% y 80%) de cada subgrupo de entrenamiento .....	99
<b>Figura 26:</b> Fluidez de membrana en el músculo esquelético .....	100
<b>Figura 27:</b> Fluidez de membrana en mitocondrias aisladas de músculo esquelético .....	101
<b>Figura 28:</b> Concentraciones de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetaldehídos (4-HDA) en homogeneizados de músculo esquelético .....	102
<b>Figura 29:</b> Efectos del ejercicio en las concentraciones de carbonilos proteicos en homogeneizados de músculo esquelético .....	103
<b>Figura 30:</b> Fluidez de membrana en miocardiocitos .....	104
<b>Figura 31:</b> Fluidez de membrana en mitocondrias cardiacas .....	105
<b>Figura 32:</b> Concentraciones de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetaldehídos (4-HDA) en homogeneizados cardiacos .....	106
<b>Figura 33:</b> Carbonilación proteica en homogeneizados de corazón .....	107
<b>Figura 34:</b> Fluidez de membrana en hepatocitos .....	108
<b>Figura 35:</b> Fluidez de membrana en mitocondrias hepáticas .....	109
<b>Figura 36:</b> Peroxidación lipídica inducida por el ejercicio agudo y el entrenamiento en homogeneizados de hígado .....	110
<b>Figura 37:</b> Concentraciones de restos carbonilos en homogeneizados de hígado .....	111
<b>Figura 38:</b> Rigidez en los sinaptosomas inducida por el ejercicio .....	112
<b>Figura 39:</b> Fluidez de membranas mitocondriales aisladas a partir del cerebro .....	113
<b>Figura 40:</b> Peroxidación lipídica en homogeneizados de cerebro .....	114
<b>Figura 41:</b> Concentraciones de carbonilos en homogeneizados de tejido nervioso .....	115

# RESUMEN



*Se requieren niveles óptimos de fluidez de membrana para una fisiología celular adecuada. Nuestro objetivo fue estudiar los efectos del ejercicio agudo y del entrenamiento regular sobre la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales, la peroxidación lipídica y la oxidación proteica en los músculos esquelético y cardíaco, hígado y cerebro.*

*50 ratas macho Sprague-Dawley fueron distribuidas en 5 grupos (n=10) en función del protocolo de ejercicio: control o sedentarias (G1), ejercicio agudo (G2) y entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas (G3, G4 y G5, respectivamente). G2-5 fueron sometidos a una prueba aguda progresiva hasta la extenuación en un tapiz rodante. Las cargas de trabajo se determinaron para los grupos de entrenamiento, teniendo en cuenta la velocidad máxima alcanzada. Las sesiones de entrenamiento fueron interválicas, alternando el 80% y el 35% de la carga máxima de trabajo, durante 1 h/día, 4 días/semana. Las membranas celulares y mitocondriales se aislaron a partir de los tejidos por centrifugación diferencial. Se determinó la fluidez por espectroscopía de fluorescencia, utilizando TMA-DPH como marcador fluorescente, y se expresó como el inverso de la polarización medida (1/P). La concentración de malonildialdehído y 4-hidroxiacetaldehído (MDA + 4-HDA) y el contenido carbonilo proteico fueron determinados en los homogeneizados de los tejidos para valorar la peroxidación lipídica y la oxidación proteica, respectivamente.*

*Nuestros resultados muestran que tanto el ejercicio agudo exhaustivo como el entrenamiento regular indujeron rigidez en las membranas celulares y mitocondriales aisladas a partir de los músculos esquelético y cardíaco, y en los sinaptosomas. La fluidez de las membranas mitocondriales hepáticas disminuyó tras el ejercicio agudo, aunque se preservaron los niveles de fluidez en las membranas de los hepatocitos. El ejercicio agudo aumentó los niveles de MDA + 4-HDA, especialmente en músculo esquelético, hígado y cerebro. Además, los niveles de carbonilos proteicos fueron mayores después del ejercicio agudo en el músculo esquelético, el corazón y el hígado. El entrenamiento corto de 1 semana también aumentó estos índices de estrés oxidativo. Sin embargo, el entrenamiento regular de larga duración de 4 ó 12 semanas no afectó ni a la peroxidación lipídica ni al contenido carbonilo proteico. Estos resultados son consistentes con la idea de que el ejercicio exacerba el daño oxidativo, lo que puede contribuir, al menos parcialmente, a explicar la rigidez en las membranas a causa del ejercicio.*





# ABSTRACT



*Optimal levels of membrane fluidity are essential for an adequate cell physiology. Our aim was to study the effects of acute exercise and regular training on cellular and mitochondrial membranes fluidity, lipid peroxidation and protein oxidation in skeletal and cardiac muscles, liver and brain.*

*50 male Sprague-Dawley rats were arranged in 5 groups (n=10) according to exercise protocol: control or non-exercise (G1), acute exercise (G2) and training of 1, 4 and 12 weeks (G3, G4 and G5, respectively). G2-5 were subjected to a progressive acute test until exhaustion in a treadmill. Workloads were determined for training groups, attending at the maximum speed achieved. Training sessions were intervallic, alternating 80% and 35% of maximal workload, for 1 h/day, and 4 days/week. Cellular and mitochondrial membranes were isolated from tissues by differential centrifugation. Fluidity was determined by fluorescence spectroscopy, using TMA-DPH as fluorescent probe, and it was expressed as the inverse of polarization measured (1/P). Malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals (MDA + 4-HDA) and protein carbonyl content were determined in the tissues homogenates to assess lipid peroxidation and protein oxidation, respectively.*

*Our results show that both, exhaustive acute exercise and regular training, induced rigidity in the cellular and mitochondrial membranes isolated from the skeletal and cardiac muscles, and in the synaptosomes. Hepatic mitochondrial membranes fluidity decreased after acute exercise, although fluidity levels were preserved in the hepatocytes membranes. Acute exercise increased MDA + 4-HDA levels, especially in skeletal muscle, liver and brain. Also, protein carbonyl levels were higher after acute exercise in the skeletal muscle, heart, and liver. Short-training for 1 week also increased these indexes of oxidative stress. However, 4 or 12 weeks of regular long-term training did not affect neither lipid peroxidation nor protein carbonyl content. These findings are consistent with the idea that exercise exaggerates oxidative damage, which may contribute, at least partially, to explain the rigidity in the membranes due to exercise.*





# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. RADICALES LIBRES

### 1.1.1. Concepto

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

Un radical libre es una especie química, bien sea átomo, molécula o parte de ésta, con existencia independiente, y que posee uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo (Halliwell, 1991). El electrón desapareado tiene un momento magnético descompensado, lo cual hace que la molécula posea carga magnética, llamándose paramagnética. Un radical libre puede ser positiva, negativa o no tener carga. El radical libre tiende a recuperar la estabilidad cediendo un electrón (agente reductor) o captando un electrón (agente oxidante). De esta forma, se estabiliza electrónicamente, aunque a expensas de desestabilizar la molécula a la que ha donado o sustraído un electrón, por lo que ésta se convierte en un nuevo radical libre (Halliwell, 1993). La vida media de los radicales libres es muy corta y depende del tiempo que tardan en reaccionar con otro átomo o molécula para conseguir captar o ceder su electrón desapareado y así compensar el *spin* de su orbital más externo.



## 1.1.2. Tipos

Existe una gran variedad de radicales libres, que pueden ser derivados del oxígeno, el nitrógeno, el carbono o el azufre.

### 1.1.2.1. Especies reactivas derivadas del oxígeno

Se denominan especies reactivas dependientes del oxígeno (EROs) tanto a los radicales libres propiamente dichos como a sus moléculas precursoras y a los derivados de éstos. Algunas son verdaderos radicales libres, como el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Otras simplemente son fuente de radicales libres, como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sin llegar a ser considerados como radicales libres, al tener sus electrones apareados (Fig. 1).

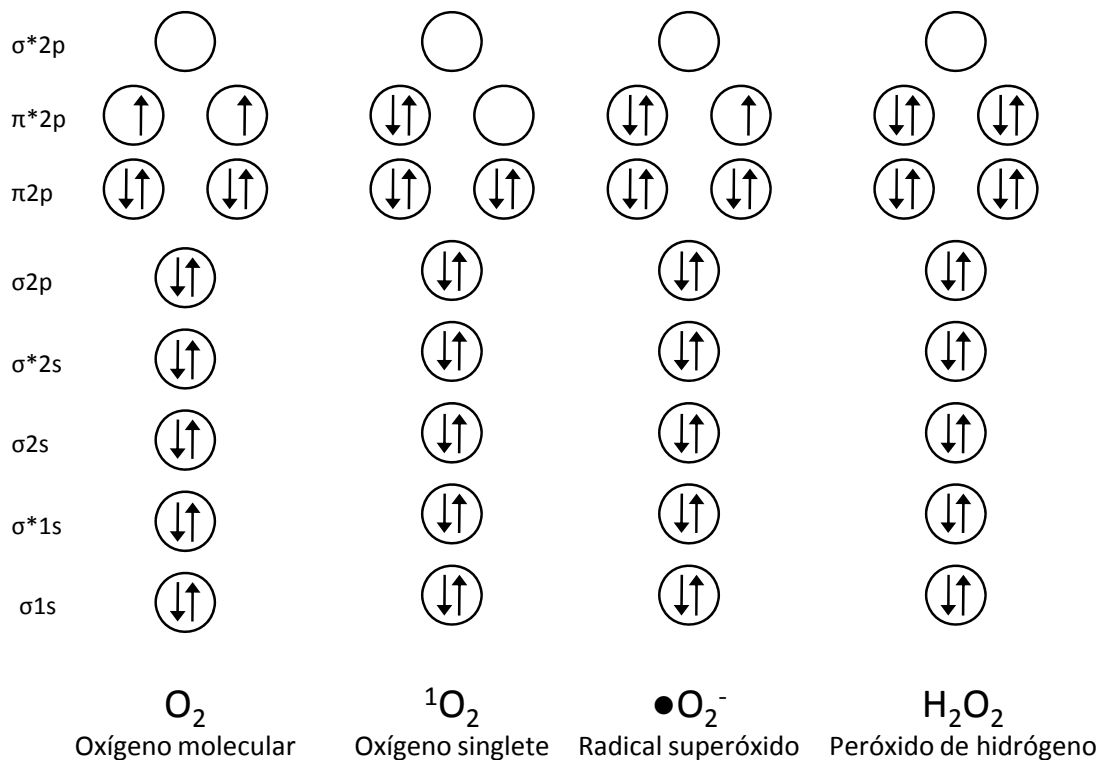


Fig. 1: Configuración electrónica de varias especies reactivas dependientes del oxígeno.

#### 1.1.2.1.1. Oxígeno molecular

En la naturaleza, el oxígeno ( $\text{O}_2$ ) aparece en forma molecular o diatómica. Éste contiene 16 electrones, distribuidos en orbitales moleculares. El oxígeno molecular es un radical libre con dos electrones desapareados en sus orbitales más externos (Fig. 1). Ambos

electrones tienen el mismo sentido de rotación, por lo que se encuentran desapareados. El oxígeno sólo interactuará con radicales cuyos electrones tengan *spines* complementarios a los del oxígeno, lo que se denomina “restricción de *spin*”. Por ello, el O<sub>2</sub> es un birradical de relativa baja reactividad.

#### 1.1.2.1.2. Oxígeno singlete

La molécula de oxígeno puede presentarse con otras configuraciones electrónicas en sus últimos orbitales. Si los dos electrones de estos orbitales se configuran con *spins* opuestos (Fig. 1) se forma una molécula llamada oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> no es un radical libre, aunque, debido a que es una forma excitada, reacciona fácilmente con otras moléculas.

El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se produce por absorción de energía electromagnética a partir del O<sub>2</sub>. Esta energía hace que uno de los electrones del último orbital cambie el sentido de su *spin*. La absorción de grandes cantidades de energía por parte del oxígeno para generar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se encuentra restringida a sucesos fotoquímicos (Zigler y Goosey, 1981; Sik y cols., 1983). También puede formarse en reacciones de oxidación de diversas especies o durante reacciones enzimáticas. El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles la energía de su excitación o combinándose con ellas. Asimismo, tiene la capacidad de sustraer un hidrogenión (H<sup>+</sup>) de un ácido graso insaturado, comenzando, de este modo, la reacción de la peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 1990a).

#### 1.1.2.1.3. Radical superóxido

El radical superóxido (●O<sub>2</sub><sup>-</sup>) procede de la reducción de una molécula de O<sub>2</sub>. Se produce en todas las células eucariotas animales, sobre todo en la mitocondria y el retículo endoplasmático (Fridovich, 1978; Nohl y Hegner, 1978).

El 1-2% de los electrones transportados en el estado 4 de la cadena respiratoria mitocondrial, un estado controlado y altamente reducido, da lugar a ●O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Boveris y cols., 1972). También se forma ●O<sub>2</sub><sup>-</sup> al producirse el estallido respiratorio de las células fagocíticas y como producto de muchas reacciones enzimáticas, como las que implican a la xantina oxidasa o al citocromo P<sub>450</sub> a nivel del retículo endoplasmático. Finalmente, con la autooxidación de moléculas como las xantinas, catecolaminas, compuestos tiólicos, flavinas y hemoproteínas, se forma ●O<sub>2</sub><sup>-</sup> en presencia de cantidades traza de metales (Valko y cols., 2005).

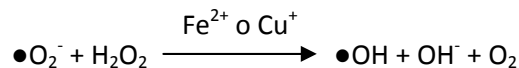
El ●O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido en la mitocondria puede lesionar los transportadores de la cadena respiratoria mitocondrial y el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (Sohal y Brunk,

1992). Aunque el  $\bullet\text{O}_2^-$  no es muy tóxico, es la principal fuente de formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que es capaz de atravesar membranas y, además, es un precursor del  $\bullet\text{OH}$ , la especie reactiva de mayor toxicidad descrita (Halliwell, 1991). Además, el  $\bullet\text{O}_2^-$  también puede reaccionar con el radical óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) y formar el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Brzeszczynska y Gwozdziński, 2008).

#### **1.1.2.1.4. Peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) no es un radical libre como tal, ya que no posee electrones desapareados en su último orbital (Fig. 1). Es la forma menos reactiva de las especies reactivas dependientes del oxígeno (ERO). Su importancia recae en su capacidad para atravesar membranas biológicas, dando lugar a reacciones de oxidación en puntos alejados de su lugar de producción.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es tóxico en concentraciones fisiológicas; sin embargo, al poder convertirse fácilmente en  $\bullet\text{OH}$  mediante la reacción de Fenton – Haber-Weiss (Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1934), el daño que puede producir dependerá de la disponibilidad y localización de metales de transición como el hierro y el cobre (Gutteridge y Halliwell, 1989).



#### **1.1.2.1.5. Radical hidroxilo**

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

En el ser vivo se puede producir  $\bullet\text{OH}$  por varios mecanismos: 1) fisión homolítica del agua; 2) ruptura fotolítica del  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; y 3) reacciones de Fenton – Haber-Weiss (Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1934). El primero, aunque es poco frecuente, puede formarse a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos  $\gamma$ ). Para el segundo, la luz ultravioleta no tiene suficiente energía como para dividir una molécula de agua, pero puede escindir una molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en dos moléculas de  $\bullet\text{OH}$ . Por último, en las reacciones de Fenton – Haber-Weiss, una

molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con una molécula de  $\bullet\text{O}_2^-$ , u otro agente reductor, para producir un  $\bullet\text{OH}$ , un  $\text{OH}^-$  y  $\text{O}_2$ .

#### 1.1.2.1.6. Radical perhidroxilo

El radical perhidroxilo ( $\text{HO}_2\bullet$ ) se genera a partir de  $\bullet\text{O}_2^-$ . Es un radical libre muy liposoluble, siendo por tanto un potente inductor de la peroxidación lipídica en las membranas biológicas (Kanner y cols., 1987).

#### 1.1.2.1.7. Radicales alcoxilo y peroxilo

Los radicales alcoxilo ( $\text{RO}\bullet$ ) y peroxilo ( $\text{ROO}\bullet$ ) son especies producidas durante la peroxidación lipídica, debido al ataque de algunos radicales libres sobre los fosfolípidos de la membrana, a nivel de las cadenas carbonadas de sus ácidos grasos. No son tan reactivos como el  $\bullet\text{OH}$ ; sin embargo, constituyen una parte esencial para el inicio y propagación de la peroxidación lipídica por toda la membrana celular (Kanner y cols., 1987).

### 1.1.2.2. Especies reactivas dependientes del nitrógeno

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

#### 1.1.2.2.1. Óxido nítrico

El óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) es un gas con una vida media de 3-5 segundos. Se produce endógenamente en diversos tipos celulares. Es catalizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).

El  $\bullet\text{NO}$  tiene, entre otras, las siguientes características funcionales: regulador del flujo sanguíneo local, antiagregante plaquetario, segundo mensajero y mediador del neurotransmisor excitador glutamato (Moncada y Higgs, 1995). Aunque posee una acción antiinflamatoria importante, también puede promover la disfunción celular y tisular, a través de un efecto proinflamatorio (Grisham y cols., 1999). Otro efecto del  $\bullet\text{NO}$  reside en su capacidad de reaccionar con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, inactivando la mayoría de las enzimas que poseen un grupo hemo. Además, puede reaccionar con los ácidos nucleicos y dar lugar a mutaciones, roturas del ADN, y evolucionar hacia la necrosis.

Mientras un exceso de este gas es citotóxico, a concentraciones fisiológicas es poco reactivo y no puede nitrar proteínas definitivamente, aunque sí puede reaccionar con otros compuestos intermedios (Beckman y Ames, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2007). Un ejemplo es la reacción entre  $\bullet\text{NO}$  y el  $\bullet\text{O}_2^-$  donde se forma el anión peroxinitrito.

#### **1.1.2.2. Anión peroxinitrito**

El anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) es un potente oxidante, responsable de gran parte de la toxicidad causada por el  $\bullet\text{NO}$  (Beckman y Ames, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2007). Se forma *in vivo* mediante la reacción del  $\bullet\text{NO}$  y el  $\bullet\text{O}_2^-$  (Radi y cols., 1991; Miles y cols., 1996; Pietraforte y Minetti, 1997).

Aunque esta reacción puede ser un mecanismo de eliminación de  $\bullet\text{O}_2^-$  sin la consiguiente formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el  $\text{ONOO}^-$  puede protonarse y formar ácido peroxinitroso ( $\text{HONOO}$ ), el cual, a su vez, se descompone con facilidad en  $\bullet\text{OH}$  y dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), ambos muy tóxicos (Janssen y cols., 1993; Lipton y cols., 1993).

El  $\text{ONOO}^-$  también induce la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interfiere la señalización celular por nitración de residuos aromáticos proteicos, degrada carbohidratos, nitra y oxida guanosina, y fragmenta ADN (Beckmann y cols., 1994; Beckman y Koppenol, 1996). Otra de sus posibles interacciones es con el  $\text{CO}_2$  generado en la mitocondria, proceso exacerbado, sobre todo, durante el ejercicio. La molécula resultante,  $\text{ONOCO}_2^-$ , se descompone, a su vez, en el radical carbonato ( $\bullet\text{CO}_3^-$ ) y en el radical dióxido de nitrógeno ( $\bullet\text{NO}_2$ ) (Squadrito y Pryor, 1998; Ducrocq y cols., 1999; Hardeland y cols., 2003; Hardeland, 2009). Todas estas acciones convierten al  $\text{ONOO}^-$  en una molécula altamente tóxica con efectos devastadores en la célula.

#### **1.1.2.3. Dióxido de nitrógeno**

El dióxido de nitrógeno ( $\bullet\text{NO}_2$ ) es un radical libre contaminante producido a partir de la oxidación del  $\bullet\text{NO}$  atmosférico (Postlethwait y cols., 1995), con suficiente poder por sí mismo como para iniciar la cadena de la peroxidación lipídica (Halliwell, 1994).

### **1.1.2.3. Radicales de átomos derivados del carbono**

Los radicales libres centrados en un átomo de carbono surgen del ataque de un radical oxidante sobre ácidos grasos. En el primer paso se extrae un átomo de hidrógeno de un grupo metileno situado entre enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un ROO●. A su vez, pueden participar en otras reacciones que generan otras especies radicales (Frei, 1994).

### **1.1.2.4. Radicales de átomos derivados del azufre**

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

## **1.1.3. Formación en los seres vivos**

### **1.1.3.1. Fuentes endógenas de radicales libres**

La principal fuente es la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Frei, 1994).

#### **1.1.3.1.1. Cadena de transporte de electrones mitocondrial**

En la mitocondria tiene lugar la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico, por medio de los cuales se producen la forma reducida de la nicotinamida adenín-dinucleótido (NADH) y la de flavín adenín-dinucleótido (FADH<sub>2</sub>). Estas moléculas transfieren electrones a la cadena respiratoria, un sistema formado por complejos enzimáticos que catalizan una cadena de reacciones redox acopladas, utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones, con el fin de generar una energía suficiente para convertir el adenosín difosfato (ADP) en adenosín trifosfato (ATP). En la respiración mitocondrial es inevitable la formación de subproductos a partir del oxígeno, los radicales libres (Yu, 1994). Este hecho origina la conocida “paradoja del oxígeno”, ya que la misma molécula que es imprescindible para la vida de los organismos aerobios, también puede comprometerla. La mitocondria es una fuente importante de EROs, entre las que se encuentran las siguientes: ●O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ●OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ●NO y ONOO<sup>-</sup>.

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

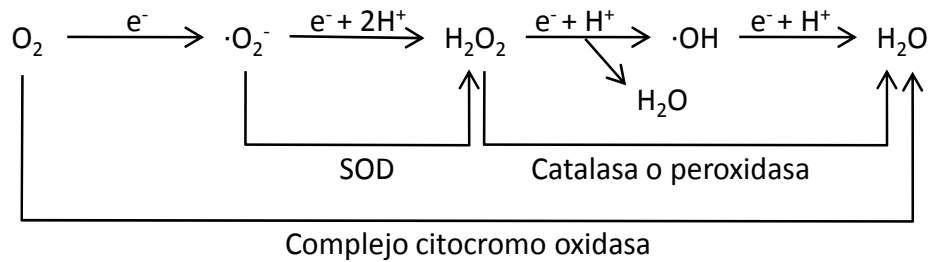


Fig. 2: Reducciones del oxígeno hasta formar agua. SOD: Superóxido dismutasa (Boveris y cols., 1972).

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

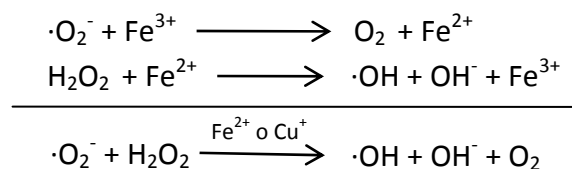
Así, el  $\bullet\text{O}_2^-$  generado da lugar, a su vez, a través de la reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), al  $\text{H}_2\text{O}_2$  capaz de atravesar las membranas y alcanzar el citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris y cols., 1972).

### 1.1.3.1.2. Citocromo P<sub>450</sub>

El citocromo P<sub>450</sub> es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias hasta mamíferos, de las que se han identificado más de 2000 isoformas, cada una de ellas con especificidad de sustrato diferente. En los seres humanos, se encuentran ampliamente distribuidas por todo el organismo, especialmente en las células del hígado y del intestino, y principalmente en el retículo endoplasmático y las mitocondrias. Salvo excepciones, el citocromo P<sub>450</sub> cataliza reacciones de monooxigenación que requieren oxígeno molecular y nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducida (NADPH) para oxidar el sustrato, pero sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido a agua. Desempeña un papel muy importante en el metabolismo de tóxicos y/o fármacos, catalizando reacciones que faciliten su metabolismo y excreción (Hodgson, 2004). Se ha propuesto la formación de  $\bullet\text{O}_2^-$  por el citocromo P<sub>450</sub> cuando se produce la reducción directa del oxígeno molecular (Koop, 1992; Goepfert y cols., 1995).

### 1.1.3.1.3. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición, da lugar a la formación de  $\bullet\text{OH}$  y OH<sup>-</sup>. En este proceso, el metal actúa únicamente como catalizador.



La necesidad de metales de transición en la reacción de Fenton convierte al hierro y al cobre, muy abundantes en los sistemas biológicos, en agentes que pueden agravar el daño oxidativo. Así, los procesos de captación y distribución del hierro, en general, están muy bien regulados, y los mamíferos disponen de proteínas de unión a estos metales como la ferritina, transferrina y ceruloplasmina, que actúan como almacenes y transportadores de estos metales e impiden que éstos participen en reacciones redox (Halliwell, 1991). En los sistemas biológicos, el hierro libre está en concentraciones muy pequeñas y, generalmente, en forma férrica para evitar que desencadene esta reacción.



#### **1.1.3.1.4. Oxidasas**

Las oxidasas más conocidas son la NADPH y la xantina oxidasa. La primera se localiza principalmente en la membrana plasmática de los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos-macrófagos y eosinófilos). Al encontrarse con un agente infeccioso, los fagocitos aumentan su consumo de oxígeno, un fenómeno conocido como el “estallido respiratorio”, que sucede en la membrana plasmática donde se encuentra el complejo NADPH oxidasa. Este sistema acepta electrones del NADH de la membrana plasmática y puede reducir sustanciasceptoras de electrones, tales como los tioles proteicos, aunque el mayor aceptor fisiológico es el  $O_2$ , cuya reducción conlleva la formación de  $\bullet O_2^-$  (De Grey, 2003; Moldovan y Moldovan, 2004). El  $\bullet O_2^-$  puede reducirse por la SOD hasta  $H_2O_2$ . Finalmente, la mieloperoxidasa incrementa notablemente la actividad microbicida del  $H_2O_2$ , dado que en presencia de cloruro se oxida para formar ácido hipocloroso (HClO).  $\bullet OH$  y HClO se forman en los fagocitos activados como mecanismo frente a microorganismos (Babior, 1978). Los fagocitos deben controlar de forma exquisita este mecanismo defensivo, ya que si se sobreactiva puede contribuir a la etiopatogenia de algunas enfermedades con base inmunológica, como la artritis reumatoide (Babior, 1978; Moslen, 1994).

La xantina oxidasa se forma por la conversión de la xantina deshidrogenasa en situaciones de hipoxia, isquemia u otras situaciones de déficit energético. La xantina deshidrogenasa es una enzima que participa en el metabolismo de las purinas, oxidando la hipoxantina a xantina y ésta, posteriormente, forma ácido úrico, utilizando el  $NAD^+$  como aceptor de electrones (Kinnula y cols., 1995). En su forma oxidasa, emplea  $O_2$  como aceptor de electrones, lo que produce radicales libres (Radi y cols., 1992). En hipoxia, la hipoxantina se va acumulando sin poder ser oxidada hasta que se produce la reoxigenación. Entonces, la xantina oxidasa cataliza la oxidación de hipoxantina formando grandes cantidades de  $\bullet O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Granger y cols., 1981; Saugstad, 1990).

#### **1.1.3.1.5. Óxido nítrico sintasa**

La óxido nítrico sintasa es una familia de tres isoenzimas que catalizan la formación de óxido nítrico: la neuronal y la endotelial, ambas expresadas constitutivamente y cuya actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio (Bredt y cols., 1991; Lamas y cols., 1992); y la inducible, que la expresan los macrófagos cuando son estimulados por citoquinas, lipopolisacáridos u otros antígenos, siendo su expresión regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, en la que participan factores de transcripción sensibles al estado

redox, como el factor nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) o las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Moncada y Higgs, 1991; Yui y cols., 1991; Lowenstein y Snyder, 1992; MacMicking y cols., 1997; Bosca y cols., 2005).

#### 1.1.3.1.6. $\beta$ -oxidación de ácidos grasos

Los microsomas, también denominados peroxisomas, realizan la metabolización o  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos con una longitud de cadena de 24 o más átomos de carbono, así como la de fenoles, formaldehídos y alcoholes, requiriendo la presencia de  $\text{O}_2$  y generando grandes cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Boveris y cols., 1972; Beckman y Ames, 1998).

#### 1.1.3.1.7. Otras enzimas

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

### 1.1.3.2. Fuentes exógenas de radicales libres

Muchos agentes antineoplásicos, tales como la adriamicina y la bleomicina, y también algunos antibióticos, son fuentes de radicales libres. Algunos de los efectos de estos fármacos se han atribuido a su capacidad para reducir oxígeno a  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\bullet\text{OH}$ . También generan radicales libres las radiaciones (rayos X o  $\gamma$ ) o partículas radiadas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ), y factores ambientales, como contaminantes aéreos, hiperoxia, pesticidas, humos del tabaco, solventes, anestésicos o hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien contienen en sí mismos radicales libres (como el humo del tabaco), o bien se convierten en ellos debido a su metabolismo, en el que actúan enzimas como las monooxigenasas (por ejemplo, el citocromo  $\text{P}_{450}$  o la flavín monooxigenasa), diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas), la epóxido hidrolasa, etc. (Philpot, 1991; Halliwell y Gutteridge, 2007).

## 1.1.4. Mecanismos de protección

La atmósfera de nuestro planeta fue anaeróbica hasta la aparición del oxígeno hace unos 2500 millones de años, como resultado de la rotura del agua en el proceso fotosintético de las primeras cianobacterias. El  $\text{O}_2$ , vital para la existencia de organismos aerobios, es a la

vez un tóxico, dada su capacidad de formación de radicales libres. Para sobrevivir en este ambiente aerobio primitivo poco favorable, los organismos desarrollaron una variedad de mecanismos de defensa antioxidante.

### 1.1.4.1. Antioxidantes

En 1995, Halliwell definió un antioxidante como “cualquier sustancia que, a bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell y cols., 1995). Los antioxidantes, desde la perspectiva bioquímica, pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros son proteínas de peso molecular elevado, que minimizan el daño oxidativo catalizando reacciones químicas. Los antioxidantes no enzimáticos, en general, son moléculas pequeñas que reaccionan directamente con los radicales libres, evitando que ejerzan su acción tóxica sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Algunas características de las principales moléculas antioxidantes presentes en el ser vivo en condiciones fisiológicas se resumen en las Tablas I y II, en función de su actividad enzimática o no.

Tabla I: Resumen de los principales antioxidantes enzimáticos biológicos. GSSG: Glutación oxidado; GSH: Glutación reducido; NADP<sup>+</sup>: Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato oxidada.

Antioxidante	Localización	Acción
<b>Superóxido dismutasas (SOD)</b>	Cu/Zn SOD	Citosol y lisosomas
	Mn SOD	Mitocondria
	Extracelular SOD	Plasma
		$\bullet\text{O}_2^- + \bullet\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
<b>Catalasa</b>	Peroxisomas y citosol	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
<b>Glutación peroxidasa (GPx)</b>	Intracelular	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
<b>Glutación reductasa (GR)</b>	Intracelular	$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$

Tabla II: Principales antioxidantes no enzimáticos. GPx: Glutatión peroxidasa; GSH: Glutatión reducido; AP-1: Proteína activadora 1; Nf-κB: Factor nuclear Kappa B.

Antioxidante	Localización	Acción
<b>Glutatión</b>	Intracelular, alveolos, etc.	Sustrato de la GPx, reacciona con $\bullet\text{OH}$ , $\bullet\text{O}_2^-$ y radicales libres orgánicos, regenera la vitamina C
<b>Vitamina E</b>	Membranas lipídicas y lipoproteínas	Depura $\bullet^1\text{O}_2$ , $\bullet\text{O}_2^-$ , $\bullet\text{OH}$ , $\bullet\text{NO}$ y $\text{RO}\bullet$ , detiene la peroxidación lipídica
<b>Vitamina C</b>	Medios celulares hidrofílicos	Depura $\bullet\text{O}_2^-$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\bullet\text{OH}$ , $^1\text{O}_2$ y $\bullet\text{NO}$ , formando radical semidehidroascorbato y contribuye a la regeneración de la vitamina E Actúa como prooxidante cuando reduce $\text{Fe}^{3+}$ a $\text{Fe}^{2+}$ y éste cataliza la reacción de Fenton
<b>Vitamina A</b>	Membranas lipídicas	Depura $\bullet\text{O}_2^-$ , $\text{ROO}\bullet$ y $^1\text{O}_2$
<b>Ácido úrico</b>	Amplia distribución	Depura $\bullet\text{OH}$ , $^1\text{O}_2$ , $\text{HClO}$ y $\text{ROO}\bullet$
<b>Quelantes</b>	Endógenos y exógenos	Unen metales de transición
<b>Bilirrubina</b>	Sangre, tejidos	Reacciona con $\text{ROO}\bullet$ y $^1\text{O}_2$
<b>Coenzima Q</b>	Cadena de transporte electrónico mitocondrial	Protege frente a la peroxidación lipídica, regenera vitamina E
<b>Flavonoides</b>	Exógenos	Reaccionan con $\text{ROO}\bullet$ , $\bullet\text{OH}$ y el $\bullet\text{O}_2^-$
<b>Glucosa</b>	Amplia distribución	Depura $\bullet\text{OH}$
<b>Cisteína</b>	Amplia distribución	Reduce compuestos orgánicos donando electrones del sulfhidrilo
<b>Melatonina</b>	Citosol, núcleo, mitocondria, membranas	Depura $\bullet\text{OH}$ , $\bullet\text{O}_2^-$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{NO}\bullet$ , $\text{HClO}$ , $\text{ONOO}^-$ , activa enzimas antioxidantes e inhibe enzimas productoras de radicales libres

### 1.1.4.2. Sistemas reparadores

Hay una serie de enzimas que, aunque en sentido estricto no deben ser consideradas como antioxidantes ya que no eliminan radicales libres, sí que participan en los procesos de reparación de las biomoléculas que han sido dañadas por ellos. Por un lado, se ha demostrado que la peroxidación lipídica estimula la fosfolipasa  $\text{A}_2$  y, por otro, que las formas peroxidadas de los fosfolípidos son el sustrato preferido de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  (Halliwell y Gutteridge, 1990b);

por lo tanto, la fosfolipasa A<sub>2</sub> degrada los fosfolípidos oxidados de la membrana (Dempsey y Halbrook, 1983; Sevanian y Kim, 1985; Dizdaroglu, 1993). También podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN, la metionina sulfóxido reductasa y las enzimas proteolíticas intracelulares, que actúan degradando proteínas oxidativamente dañadas, evitando su acumulación (Davies y cols., 1986; Giulivi y Davies, 1990).

### **1.1.5. Estrés y daño oxidativo**

En condiciones fisiológicas, la generación de radicales libres está relativamente bien contrarrestada con los sistemas de defensa antioxidante. Pero cuando se rompe el equilibrio a favor de la formación de radicales libres, se genera el fenómeno conocido como estrés oxidativo. Éste se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies y Mehlhorn, 1986). Así pues, puede originarse por un exceso de elementos prooxidantes (exposición a radiación ionizante, radiación UV intensa, toxinas, estrés psicológico o físico, y ciertas patologías), por una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez. La acción de los radicales libres sobre los constituyentes estructurales celulares produce una agresión interna continuada, que amenaza la integridad funcional de todas las biomoléculas. Las consecuencias patológicas dependerán entonces del tipo de constituyente celular que se dañe.

#### **1.1.5.1. Peroxidación lipídica**

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

La reacción comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso y le extrae un átomo de hidrógeno. Esta reacción se produce principalmente en los carbonos contiguos a dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el  $\text{O}_2$  y forma un  $\text{ROO}\bullet$  y otras moléculas como endoperóxidos, hidroperóxidos y cicloperóxidos (Curtis y cols., 1984). El nuevo  $\text{ROO}\bullet$  formado es capaz, a su vez, de extraer otro átomo de hidrógeno de un fosfolípido adyacente,

formando un radical alquilo ( $R\bullet$ ) y un peróxido lipídico (ROOH), propagando así una reacción en cadena que se extiende por toda la membrana (Kanner y cols., 1987; Hunt y cols., 1988). La reacción sólo termina cuando los radicales libres interaccionan con moléculas antioxidantes o bien mediante la fragmentación de los ácidos grasos en un gran número de productos hasta que se agota el sustrato, lo que implica la muerte celular. De forma esquemática, la reacción de la peroxidación lipídica se divide en cuatro pasos: iniciación, propagación, ramificación y terminación (Fig. 3). Además, la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados produce la formación de uniones cruzadas bien entre fosfolípidos o bien entre fosfolípidos, y proteínas (Bruch y Thayer, 1983; Curtis y cols., 1984). Estas alteraciones estructurales son las principales responsables de la aparición de rigidez en las membranas biológicas cuando éstas son expuestas a radicales libres y, por tanto, determinan su pérdida funcional (Dobretsov y cols., 1977; Bruch y Thayer, 1983; Schroeder, 1984; Garzetti y cols., 1993; Chen y Yu, 1994).

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

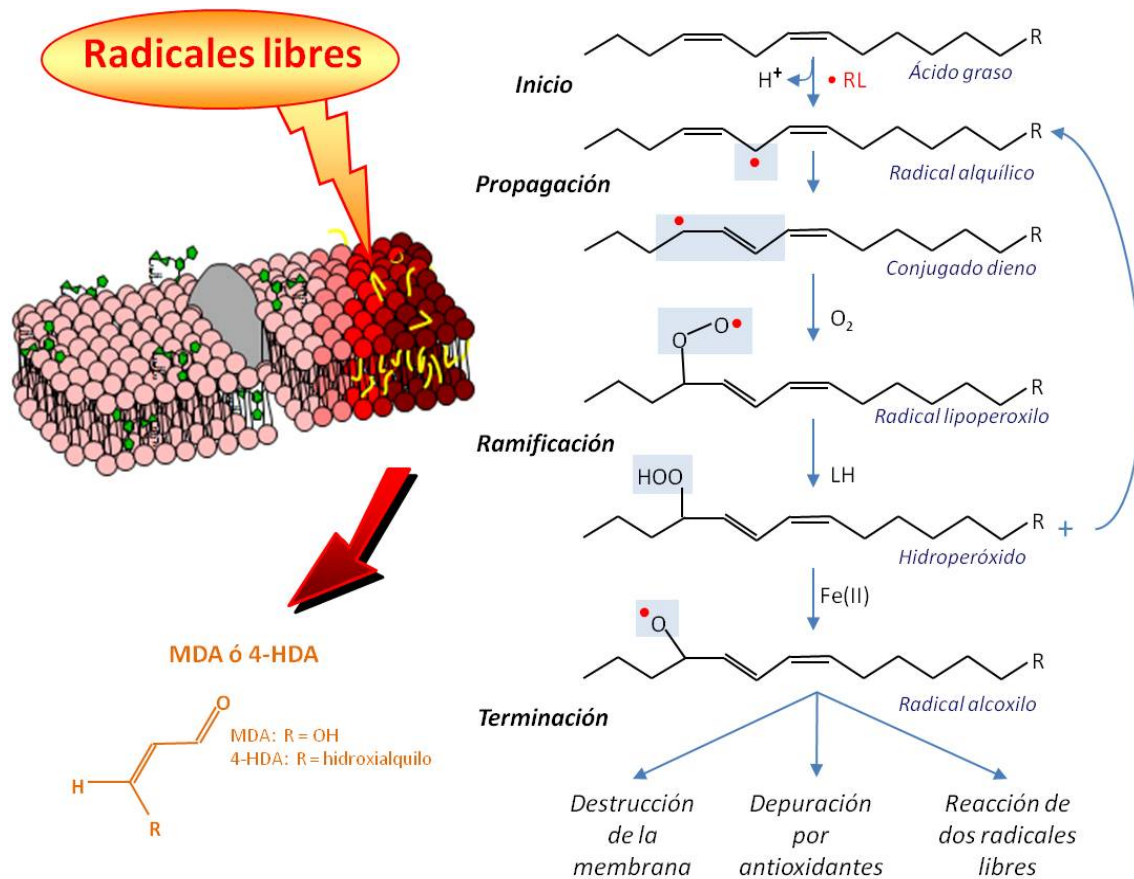


Fig. 3: Reacciones principales de la peroxidación lipídica.  $\bullet RL$ : radical libre, LH: lípido intacto, MDA: malonildialdehído, 4-HDA: 4-hidroxialquenes.

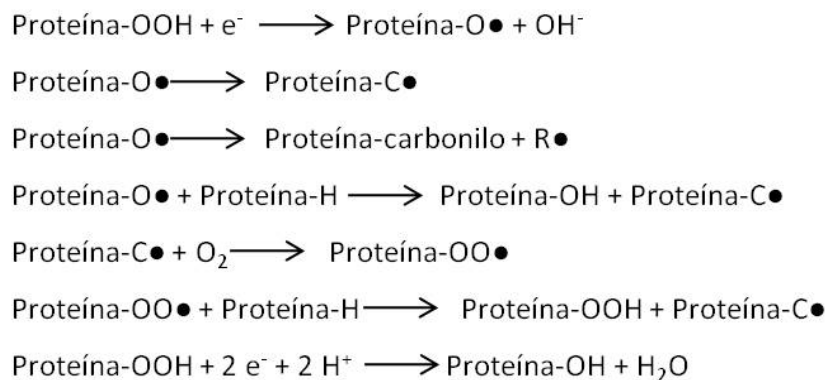
### 1.1.5.2. Daño oxidativo a las proteínas

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

Las alteraciones bioquímicas que producen los radicales libres en las proteínas incluyen oxidaciones de las cadenas laterales, fragmentación de la cadena peptídica, formación de enlaces cruzados entre proteínas, modificación de los puentes disulfuro y los enlaces no covalentes (como los de hidrógeno), cambios de conformación, alteración de la hidrofobicidad,

y adquisición de otros grupos reactivos (como, por ejemplo, la 3,4-dihidroxifenilalanina, los hidroperóxidos y los carbonilos) (Davies y Goldberg, 1987; Dean y cols., 1997; Stadtman, 2001; Davies, 2003). Un caso a destacar es cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y las formas reducidas del hierro y cobre interaccionan en los sitios de unión de estos metales a las proteínas, produciendo radicales libres que oxidan inmediatamente a los residuos de aminoácidos vecinos. En muchas enzimas, este sitio de unión de metales puede ser el centro activo, por lo que el ataque de radicales libres anularía su funcionalidad (Stadtman, 1993).

Aunque la reacción de las proteínas con los radicales libres no se puede considerar como una reacción en cadena *per se*, también se produce una serie de reacciones sucesivas (Fig. 4) (Headlam y Davies, 2003):



*Fig. 4: Reacciones de los radicales libres con las proteínas.*

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

### **1.1.5.3. Daño oxidativo al ADN**

El ADN también es muy susceptible al daño oxidativo. El oxígeno es capaz de combinarse con las bases o los glúcidos del ADN. Cuando un radical libre ataca a una desoxirribosa del ADN, generalmente se produce una ruptura de la cadena. Sin embargo, la cadena complementaria, que permanece intacta, puede mantener juntos los dos extremos de la cadena dañada hasta que actúen las enzimas reparadoras. De este modo, este tipo de daño habitualmente no es crítico para la célula, salvo que la rotura se encuentre cercana a las dos



cadena (Breen y Murphy, 1995). La adición de los radicales libres a las bases del ADN es más habitual, y da lugar a una gran variedad de productos derivados, siendo uno de los más importantes la 8-hidroxi-deoxiguanosina. También se pueden formar puentes cruzados ADN-proteína. La cantidad del nucleótido 8-hidroxi-deoxiguanosina tisular o en orina se puede utilizar como índice del daño oxidativo al ADN *in vivo* (Fraga y cols., 1990).

Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación, o cuando el ADN alterado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell, 1991; Breen y Murphy, 1995). Las lesiones oxidativas al ADN y la mutagénesis son causas importantes del cáncer (Ames y cols., 1993). Se cree que, al menos, en el caso del ADN nuclear, el hierro desempeña un papel importante en el daño oxidativo. Si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> llega al núcleo, en presencia de hierro ferroso genera •OH, que ataca al azúcar o a la base, produciendo roturas de hebra y modificaciones en las bases (Imlay y cols., 1988).

El daño oxidativo al ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear (Richter y cols., 1988). La mitocondria es la principal fuente de radicales libres en reposo, los cuales actuarían sobre los lípidos de la membrana mitocondrial, las proteínas de sus sistemas enzimáticos y, fundamentalmente, sobre el ADN mitocondrial. Además, éste es muy susceptible al daño oxidativo debido a que, al contrario que el ADN nuclear, carece de los mecanismos de reparación adecuados y no tiene la protección que suponen las histonas y poliaminas (Schapira y Cooper, 1992). Esto ha llevado a pensar que el daño oxidativo sobre estructuras mitocondriales desarrolle un papel determinante en los procesos de envejecimiento: la denominada “teoría mitocondrial del envejecimiento”, inicialmente propuesta por Harman en 1972 y desarrollada por Miquel en 1980 (Harman, 1972; Miquel y cols., 1980).

#### **1.1.5.4. Daño oxidativo a los glúcidos**

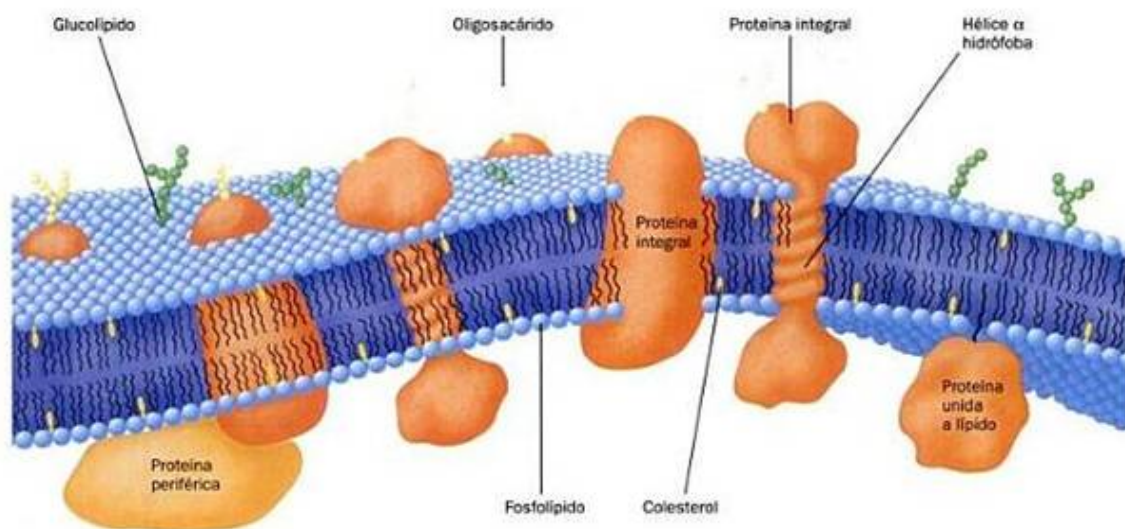
Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa, la manosa y el manitol son depuradores del •O<sub>2</sub><sup>-</sup>; al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas, actúan como agentes protectores celulares (Albertini y cols., 1996). El daño oxidativo a los glúcidos reviste gran importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados (Monboisse y Borel, 1992). Un caso especial es el del ácido hialurónico, cuya función estructural es contribuir a la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes, sobre todo al •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de

viscosidad del fluido sinovial, como sucede en la etiopatogenia de la artritis reumatoide (Greenwald y Moy, 1980; Grootveld y cols., 1991).

### 1.1.5.5. Efecto de los radicales libres en las membranas

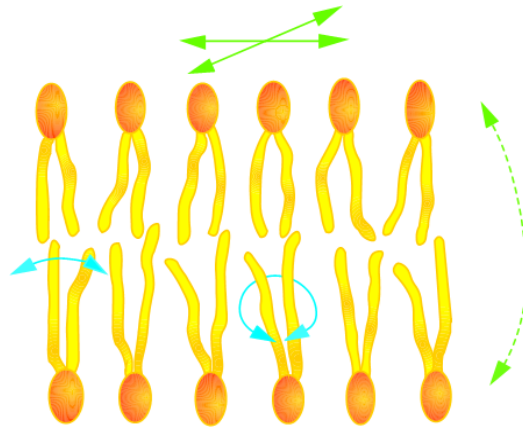
Las membranas de las células eucariotas no son estructuras estáticas, al contrario, se caracterizan por ser plásticas. Con unos 5 nm de espesor, están formadas básicamente por una doble capa de lípidos entre los que se intercalan proteínas que atraviesan total o parcialmente la bicapa lipídica. Entre los lípidos destacan los siguientes: fosfatidilcolina, esfingomiolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, todos ellos del tipo fosfolípido, 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 (Fig. 5). La proporción exacta de todas estas moléculas varía según el tipo de membrana celular y guarda una estrecha relación con su función.

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



*Fig. 5: Modelo de mosaico fluido por el que se explica la estructura de las membranas celulares. Adaptada de Voet y cols., 2007.*

Las uniones tanto entre lípidos como entre éstos con proteínas son débiles enlaces no covalentes. Esto permite 4 tipos de movimientos de lípidos (Fig. 6): 1) difusión, en el que los fosfolípidos se mueven lateralmente en el plano de la membrana; 2) rotación, donde los fosfolípidos rotan sobre su eje vertical; 3) flexión y extensión, de las colas hidrófobas; y 4) flip – flop, con producción del salto de un fosfolípido de una hemicapa a la otra.



*Fig. 6: Movimientos de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de una membrana celular. Las flechas verdes indican los que implican un desplazamiento neto de la molécula entre dos posiciones en el plano de la membrana y las azules indican los movimientos sin desplazamiento neto.*

La composición de la bicapa lipídica y la disposición de las proteínas en las membranas son asimétricas. Esto significa que se establecen dominios lipídicos y proteicos diferentes en ambas caras, 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 y cols., 2001).

Es un hecho aceptado que las membranas biológicas requieren un estado fluido para desarrollar sus funciones correctamente. Por ello, conocer la estructura y las propiedades físicas de la bicapa constituye 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 o adenilato ciclasa, la aglutinación plaquetaria, la fagocitosis, algunas funciones relacionadas con la inmunidad, etc., son buenos ejemplos de actividades celulares moduladas por el comportamiento físico de los lípidos de la membrana (Fischkoff y Vanderkooi, 1975; Cooper y Hamilton, 1977; Heron y cols., 1980; Shinitzky, 1984; Stubbs y Smith, 1984; Houslay, 1985; Levi y cols., 1990; Tomita-Yamaguchi y cols., 1991; Viani y cols.,

1991; Vlasic y cols., 1993; Slater y cols., 1994; Sunshine y McNamee, 1994; Dumas y cols., 1997).

Debido a su composición, las membranas celulares son muy susceptibles de ser atacadas por los radicales libres. El principal efecto que tienen éstos es iniciar la LPO que, como hemos visto antes, afecta a los fosfolípidos, sobre todo si son poliinsaturados, dada la cantidad de dobles enlaces que poseen (Rice-Evans y Burdon, 1993; Gutteridge, 1995). Así, debe considerarse 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 lípidos – proteínas, los cuales también afectan a la membrana, aumentando su rigidez (Chen y Yu, 1994). Este cambio en su fluidez altera todas las funciones anteriormente descritas.

## 1.2. EJERCICIO FÍSICO

### 1.2.1. Actividad física y salud

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



*Fig. 7: Concepto de salud como un estado cambiante dentro de un continuo.*

Entre los determinantes de salud, hay una serie de factores fundamentales, tanto intrínsecos como extrínsecos, necesarios para conservarla y evitar las enfermedades. Entre ellos, cabe destacar los siguientes: 1) la edad y los factores hereditarios, que no pueden ser modificados, pero sí tenerse en cuenta en la prevención de enfermedades; 2) el medio ambiente, ya que un entorno libre de elementos patógenos ayuda a mejorar nuestro nivel de salud; 3) la existencia de un sistema sanitario capaz de actuar a nivel de la salud pública, tanto para prevenir enfermedades como tratarlas; y 4) la adquisición de hábitos de vida saludables, entre los que se debe incluir la práctica regular de ejercicio físico, una alimentación sana, y evitar conductas de riesgo (Pate y Macera, 1994).

En cuanto al estilo de vida de las personas, Mendoza y cols. (1994) lo definieron como “el conjunto de patrones de conducta que caracterizan la manera general de vivir de un individuo o grupo”. Por lo tanto, podría establecerse que un adecuado estilo de vida conduce, en gran medida, a un buen estado de salud, y éste determina la calidad de vida (Coreil y cols., 2001).

## **1.2.2. Fisiología del ejercicio**

Existen pocas situaciones fisiológicas que alcancen el grado de estrés que sufre el cuerpo humano durante el ejercicio físico intenso, donde se producen aumentos drásticos de los ritmos cardíaco y respiratorio, de la presión arterial, de la temperatura, etc., adquiriendo estas constantes biológicas valores que, fuera de este contexto de adaptación al esfuerzo físico, serían considerados como signos evidentes de estado patológico.

### **1.2.2.1. Clasificación de los ejercicios**

Podemos clasificar al ejercicio físico según diversos criterios, que atienden, principalmente, a la masa muscular utilizada, al tipo de contracción muscular, a la potencia y al metabolismo energético empleados, al nivel de agotamiento alcanzado, así como a la continuidad del esfuerzo (García Morales, 2007).

Según la masa muscular utilizada, el ejercicio físico puede ser local, cuando interviene menos de un tercio de la masa muscular total; regional, si la participación es entre un tercio y la mitad de la masa muscular total; y global, en el que interviene más de la mitad de la masa muscular total.

Dentro de la contracción muscular, se distinguen tres tipos: isotónica, isométrica e isocinética. La isotónica es una contracción constante del músculo, que produce una variación de su longitud. Se divide en concéntrica (los extremos del músculo se acercan) y excéntrica (los extremos del músculo se alejan durante la contracción). En la isométrica, la contracción no produce variación en la longitud muscular. Por último, en la isocinética, la velocidad de contracción es constante, y la tensión muscular varía a lo largo del recorrido.

En cuanto a los criterios de potencia, el ejercicio se puede dividir en: ejercicio de resistencia, que es de potencia baja, lo que implica realizar el mismo trabajo en más tiempo, por ejemplo, carrera continua o bicicleta; ejercicio de fuerza, que supone una potencia media, donde el objetivo es mover la máxima carga posible, por ejemplo, levantamiento de peso o

saltos; y ejercicio de velocidad, con potencia alta, cuyo objetivo es recorrer la distancia en el menor tiempo o lanzar un objeto lo más lejos posible.

Como aspectos metabólicos, se tienen en cuenta el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ), que permitiría calcular, dependiendo de su nivel, la intensidad del ejercicio realizado. La frecuencia cardiaca (FC) viene definida como los latidos cardiacos por minuto necesarios durante el ejercicio. También se analizan los equivalentes metabólicos (METs) utilizados, siendo éstos el  $VO_2$  (mL/min) por kg de masa corporal en reposo. Otro criterio a tener en cuenta es la vía metabólica de obtención de energía, que es obtenida del ATP y es necesaria para la contracción muscular, al igual que para el resto de las funciones celulares. Según la necesidad o no de  $O_2$ , se clasifican en vías aeróbicas o anaeróbicas.

El nivel de agotamiento físico viene determinado según la intensidad ejercida. De esta forma, cuando ésta es máxima, el ejercicio se lleva hasta el agotamiento; mientras que si es submáxima, no se alcanza ese nivel.

Por último, según su continuidad, un ejercicio es considerado agudo cuando se realiza una sola vez, de forma puntual. Por otra parte, si se realiza de forma continua y prolongada a lo largo de un periodo de tiempo, como es el caso de un entrenamiento, se le denomina ejercicio crónico.

### **1.2.2.2. Fases del ejercicio**

La práctica del ejercicio físico requiere que el organismo produzca una amplia serie de respuestas. Independientemente de la clasificación utilizada, todo ejercicio desarrolla unas fases sucesivas: entrada, estabilización, fatiga y recuperación.

#### **1.2.2.2.1. Fase de entrada**

Es el periodo comprendido desde el estado de reposo al de activación. No todas las funciones se activan al mismo tiempo. Es una fase donde predomina el metabolismo anaeróbico, en la que se produce el llamado déficit de oxígeno (Fig. 8) porque las demandas de  $O_2$  son mayores que su captación y distribución.

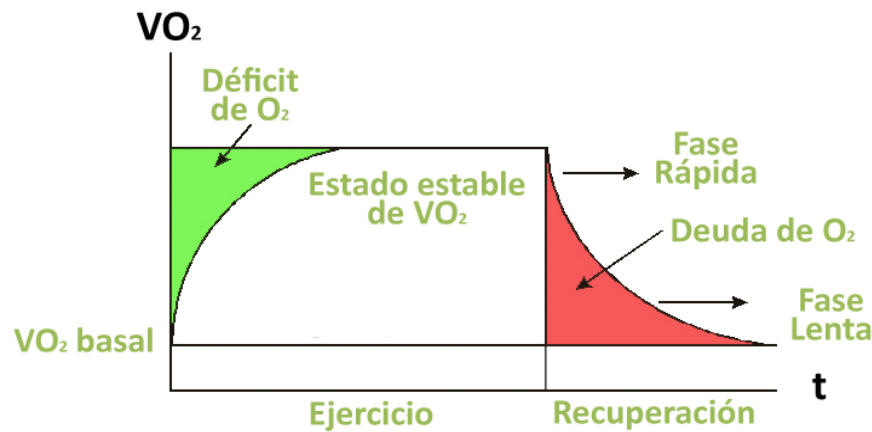


Fig. 8: Fases de consumo de oxígeno durante el ejercicio.

Modificada de Wilmore y Costill, 2004.

#### 1.2.2.2.2. Fase de estabilización

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

#### 1.2.2.2.3. Fase de fatiga

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

#### 1.2.2.2.4. Fase de recuperación

Comienza una vez que el esfuerzo físico ha concluido. Se produce un descenso de la captación de  $O_2$ , de la FC, de la presión arterial (PA), etc., acercándose estos valores progresivamente a los niveles de reposo. Se desarrolla en dos subfases: una rápida, que dura aproximadamente un minuto, y otra lenta, de mayor duración, en la que se llega hasta el estado de reposo (Fig. 8).



### **1.2.2.3. Adaptaciones al ejercicio**

Durante el ejercicio se producen una serie de cambios en varios aparatos y sistemas. A continuación reseñamos los más importantes:

#### **1.2.2.3.1. Sistema cardiovascular y hematológico**

El sistema cardiovascular es un circuito, formado por una bomba (corazón) que mueve un fluido (sangre) a través de unos canales (vasos sanguíneos). Al aumentar las necesidades metabólicas durante el ejercicio, este sistema de transporte debe adaptarse a los nuevos requerimientos.

La FC constituye uno de los indicadores más sencillos e informativos sobre la adaptación cardíaca al nivel de esfuerzo realizado. En reposo, para un individuo de edad media, la FC normal se sitúa entre 60 y 80 latidos por minuto (lpm). Al comenzar una carga de trabajo físico, sobre todo si es de resistencia, la FC aumenta progresivamente en proporción a la intensidad del ejercicio hasta alcanzar una meseta. Si el esfuerzo físico aumenta nuevamente, la FC lo hace de manera análoga hasta estabilizar de nuevo una meseta. Cuando el ejercicio se prolonga mucho o si la intensidad alcanzada es máxima, la FC aumentará hasta llegar a un límite que no se puede sobrepasar, al que llamaremos FC máxima. En ejercicios de fuerza este aumento es menor que en los de resistencia, ya que hay menos tiempo para que se produzca la adaptación. La FC máxima es un valor que se mantiene constante durante un largo periodo de tiempo y sufre pocos cambios con la edad o el entrenamiento; por tanto, tomar este valor como referencia es útil a la hora de definir la intensidad de un ejercicio (Wilmore y Costill, 2004).

En lo referente al entrenamiento, la FC en reposo desciende. Además, en personas entrenadas que realizan ejercicios de tipo submáximo, se registran FC menores frente a un mismo nivel de intensidad de esfuerzo, mientras que la FC máxima tiende a ser más estable, aunque puede disminuir levemente para optimizar el gasto cardíaco. Otra de las adaptaciones es la que supone aminorar el tiempo de recuperación tras el esfuerzo. De hecho, este parámetro puede utilizarse para determinar el grado de mejora en el rendimiento de un sujeto que realiza un programa de entrenamiento.

Otra medida que define la efectividad del corazón es el volumen sanguíneo que se eyecta en cada latido, denominado como volumen sistólico de eyección (Vs). Al comenzar el ejercicio, el Vs se eleva rápidamente hasta alcanzar el nivel del 40-60% de su capacidad

máxima, a partir del cual se mantiene casi estable. En reposo, el  $V_s$  de eyección para una persona no entrenada es de unos 70-80 mL, mientras que, mediante un entrenamiento de resistencia, este volumen puede llegar hasta los 80-110 mL en reposo (Wilmore y Costill, 2004). El aumento del retorno venoso es uno de los factores que influye en el  $V_s$ , ya que al llegar más sangre al corazón y distenderse más la pared ventricular, se provoca un aumento en la fuerza de eyección de la sangre, efecto conocido como el “mecanismo de Frank-Starling”. Los incrementos combinados de la FC y del  $V_s$  durante el ejercicio físico agudo implican una elevación del gasto cardiaco, que es proporcional al nivel del esfuerzo desarrollado (Fig. 9). Así, este parámetro, que en reposo es de unos 5-6 L, durante un esfuerzo máximo puede aumentar hasta los 20-35 L.

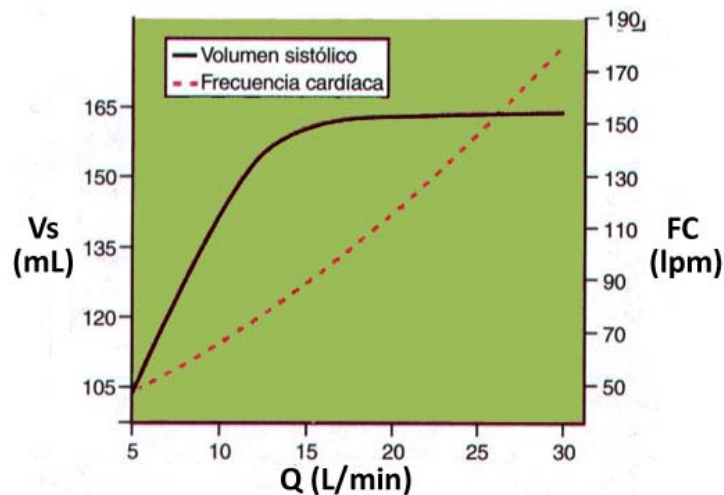
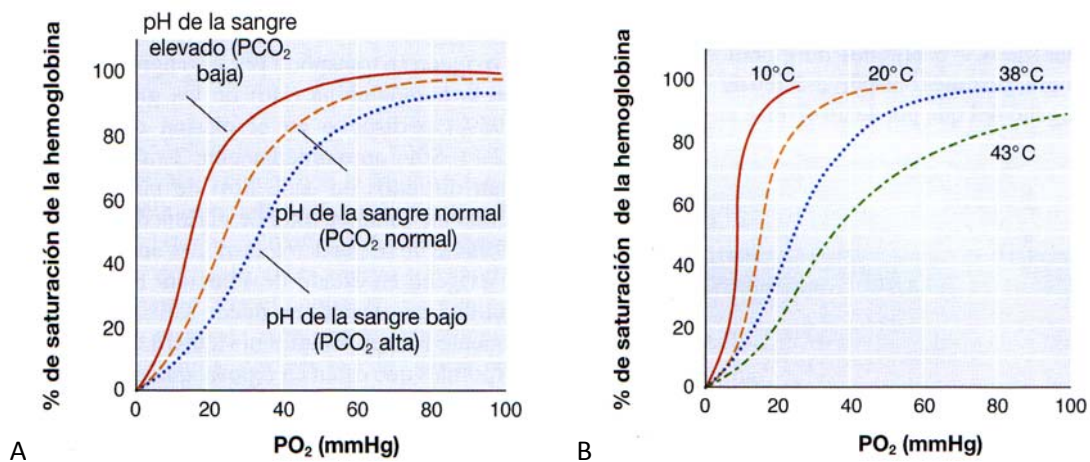


Fig. 9: Relación entre gasto cardiaco ( $Q$ ), volumen sistólico de eyección ( $V_s$ ) (—) y frecuencia cardiaca ( $FC$ ) (- -) en latidos por minuto ( $lpm$ ). Adaptada de Guyton y Hall, 2006.

Como consecuencia del aumento del gasto cardiaco, la PA se eleva. En ejercicios de resistencia, la PA sistólica aumenta en proporción directa a la intensidad del ejercicio, siendo posibles cifras de 240 – 250 mmHg en personas jóvenes (Berne y cols., 2009). Esta adaptación ayuda a la sangre a circular más rápidamente por las arterias y, por tanto, aumenta el flujo que llega a los capilares, lo que mejora la irrigación de los tejidos activos, a la vez que incrementa el hematocrito por hemoconcentración. Esta policitemia relativa, producida durante el ejercicio físico agudo, mejora el rendimiento del sistema de transporte de oxígeno en un momento en el que el organismo demanda mayores requerimientos debido al alto consumo muscular. Por el contrario, la PA diastólica apenas sufre cambios en ejercicios de resistencia. En ejercicios de fuerza ambas presiones, sistólica y diastólica, aumentan de forma considerable. En este tipo de ejercicios, la PA puede alcanzar incluso valores que superen los 350-480 mmHg de sistólica al

acompañarse de la maniobra de Valsalva (MacDougall y cols., 1985). Después de un programa de entrenamiento, las personas hipertensas experimentan un descenso en los niveles basales de PA, especialmente en la sistólica (Wilmore y Costill, 2004).

El lecho vascular también se adapta redistribuyendo la sangre hacia los tejidos que más necesidades tienen, hecho que se produce gracias a una vasoconstricción esplácnica y renal, circulaciones con apenas actividad durante el ejercicio físico, y una vasodilatación a nivel muscular. Por otra parte, algunos órganos, como el cerebro, deben mantener una irrigación constante. El aumento del metabolismo muscular durante el ejercicio conlleva efectos locales, como un incremento de la acidosis, de la concentración de  $\text{CO}_2$  y de la temperatura, así como un descenso de la presión parcial de  $\text{O}_2$  ( $\text{PO}_2$ ). Esto contribuye a la regulación del flujo sanguíneo muscular. Gracias a esta acidosis e hipertermia, la curva de saturación de la hemoglobina (Hb) se desplaza a la derecha, es decir, se facilita la liberación del oxígeno ya que éste se disocia de la Hb con más facilidad (Guyton y Hall, 2006) (Fig. 10). En cambio, el aumento de la velocidad de la circulación sanguínea durante la actividad física, combinado con la acción de los radicales libres generados, produce una hemólisis, lo que reduce la cantidad de glóbulos rojos disponibles para el transporte de oxígeno y determina la denominada anemia del deportista (Wilmore y Costill, 2004).



*Fig. 10: Efecto del pH (A) y de la temperatura (B) en la curva de saturación de la hemoglobina. Adaptada de Wilmore y Costill, 2004.*

El entrenamiento también produce una elevación del volumen plasmático, posiblemente a causa de la acción de hormonas, como la aldosterona, o al aumento de las proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina (Yang y cols., 1998). Esto, unido a la disminución de la agregación plaquetaria que produce el entrenamiento, reduce la viscosidad

sanguínea y, así, facilita la circulación (Lippi y Maffulli, 2009). La hemodilución provocada por el entrenamiento conlleva a requerir menores necesidades cardiocirculatorias durante el reposo, con la consecuente disminución del trabajo cardíaco y de las resistencias periféricas.

Finalmente, tras un entrenamiento de resistencia, el corazón aumenta su volumen, peso y grosor de la pared ventricular. Esto se debe a que el miocardio se hipertrofia, al igual que puede suceder con el músculo esquelético. Esta adaptación se conoce como corazón del deportista (Wilmore y Costill, 2004).

#### **1.2.2.3.2. Aparato respiratorio**

Durante el ejercicio agudo la ventilación aumenta, reduciéndose la duración de la inspiración y aumentando su profundidad. Para ello, la presión intratorácica se negativiza rápidamente gracias a la acción de los músculos inspiratorios principales y accesorios. La fase de espiración también se acorta. Ésta deja de ser un fenómeno pasivo debido a los elementos elásticos pulmonares, como sucede durante el reposo, y a que entran en acción los músculos espiratorios. La frecuencia respiratoria aumenta de 12 ventilaciones por minuto (ciclos/min) en reposo hasta 45-50 ciclos/min. Gracias a ello, el volumen de aire movilizado durante un esfuerzo físico agudo puede alcanzar los 120-200 L/min en personas entrenadas (Wilmore y Costill, 2004). En reposo, la ventilación se mantiene similar tanto en sujetos sedentarios como entrenados.

Durante el ejercicio, los gradientes alveolo-capilares de los gases respiratorios aumentan, lo que facilita la difusión de los gases respiratorios. A esto se suma un aumento en el flujo sanguíneo pulmonar, en especial en los vértices, las zonas peor perfundidas en reposo. Como consecuencia, hay más sangre en los capilares perialveolares para captar el  $O_2$  (Wilmore y Costill, 2004).

Un parámetro de capital importancia en la valoración funcional del deportista es el  $VO_2$ , que viene determinado por la ventilación y difusión pulmonar, el transporte de  $O_2$ , y la captación de éste por las células. En reposo, se produce un ligero aumento del  $VO_2$  en deportistas muy entrenados, debido a la elevación de su metabolismo basal, y durante los ejercicios submáximos apenas se aprecia alguna variación. El  $VO_2$  máximo ( $VO_{2max}$ ) es el mayor nivel de  $VO_2$  alcanzable al realizar esfuerzos físicos de gran intensidad. Cuanto mayor sea el esfuerzo realizado, el  $VO_2$  aumentará más, hasta alcanzar un límite a partir del cual, aunque se produzca un incremento de la carga de trabajo, el  $VO_2$  se estabilizará o incluso se reducirá muy ligeramente. Este fenómeno, conocido como meseta del  $VO_2$ , mejora con el

entrenamiento de resistencia (Pollock, 1973), aunque se considera que su factor determinante es el genético.

### **1.2.2.3.3. Adaptaciones metabólicas**

Las fibras musculares esqueléticas, al igual que la mayoría de las células del organismo, pueden obtener la energía necesaria para su contracción a partir de varias fuentes energéticas. Tanto la cantidad de energía que necesite, como la rapidez en la demanda, definirán qué vía metabólica utiliza el músculo preferentemente para conseguir el ATP. De esta manera, la energía necesaria para desempeñar ejercicios de intensidad leve o moderada, o de larga duración, proviene fundamentalmente de la vía aeróbica; es decir, del metabolismo de los hidratos de carbono y las grasas con la participación del oxígeno. En general, se puede afirmar que la energía necesaria para realizar actividades físicas de larga duración procede principalmente de la oxidación de glucosa en las mitocondrias, con una pequeña aportación de las reacciones anaeróbicas que tienen lugar en el citosol. Ante una demanda súbita de energía, es la vía anaeróbica la que es utilizada rápidamente. Su principal limitación es el bajo rendimiento, ya que proporciona mucha menos energía, y genera productos de desecho que alteran la fisiología muscular, como el ácido láctico o su base conjugada, el lactato, con cuya medición podemos estimar el uso de esta vía metabólica.

Conseguir la energía exclusivamente a partir de un sistema energético es muy difícil debido al solapamiento de todas las vías, aunque siempre predomina una sobre la otra (López Chicharro y Aznar Laín, 2004). Según un planteamiento clásico, el sistema anaeróbico glucolítico predominaba sobre el aeróbico hasta los 120 segundos de ejecución del ejercicio, momento en el que se producía la transición a favor del aeróbico. Esto se debe a que la activación de la vía aeróbica no es inmediata, sino que tarda ese tiempo en alcanzarse el nivel de las exigencias energéticas. En los últimos años, este planteamiento se ha cuestionado, ya que es a partir de los 60 segundos de ejercicio cuando la vía aeróbica cobra un mayor protagonismo que la vía anaeróbica glucolítica (Yamamoto y Kanehisa, 1995).

En ejercicios de baja intensidad, el déficit de oxígeno es muy pequeño, y la energía necesaria se obtiene principalmente de la oxidación de ácidos grasos e hidratos de carbono desde el principio. A medida que se incrementa la intensidad y, por tanto, la necesidad de energía, la vía anaeróbica va adquiriendo mayor relevancia, lo que conlleva a la elevación del lactato en la sangre. Si continúa creciendo la intensidad del ejercicio, llegará un momento en el que no se pueda consumir más oxígeno, es decir, se habrá alcanzado el  $VO_2$ max. El denominado umbral anaeróbico refleja la incapacidad de aportar el suficiente oxígeno a las

células activas para mantener la vía aeróbica (Hill y cols., 1924). La intensidad del ejercicio podrá seguir aumentando hasta que la vía metabólica anaeróbica se agote, momento en el que se alcanza la intensidad máxima de trabajo.

Gracias al aumento de la concentración de ácido láctico disminuye el pH local, lo que provoca vasodilatación, permite una mejor disociación del O<sub>2</sub> de la Hb y, por tanto, puede aprovecharse mejor el oxígeno transportado por los hematíes. Pero si la acidosis es muy marcada podría afectar a la actividad de las enzimas que catalizan las reacciones de producción de energía. Para contrarrestarla, poseemos sistemas amortiguadores como el del bicarbonato, un amortiguador biológico muy relacionado con la ventilación pulmonar. El aparato respiratorio, a corto plazo, y el riñón, a largo plazo, son los principales órganos reguladores del pH sanguíneo (Guyton y Hall, 2006).

Con el entrenamiento se produce un aumento de la capacidad aeróbica, lo que permite consumir más oxígeno durante el ejercicio, aumentando así la intensidad de trabajo máximo que se puede realizar (Getchell y Moore, 1975; Orlander y cols., 1977; Hickson y cols., 1982). En este sentido, el entrenamiento puede mejorar el VO<sub>2</sub>max en torno a un 15-20% (Pollock, 1973).

### **1.2.3. Actividad física, radicales libres y antioxidantes**

Fue en los años 70 cuando, por primera vez, se propuso que el ejercicio producía un incremento del estrés oxidativo al demostrarse aumentos de la LPO, tanto en humanos, midiendo el pentano espirado después de realizar una cicloergometría (Dillard y cols., 1978), como en ratas tras nadar hasta la extenuación, analizando el aumento de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Brady y cols., 1979). En los 80, Davies y cols. (1982a) describieron que en el músculo tenía lugar una sobreproducción de EROs responsables de estrés oxidativo durante la actividad física. Esta situación confirmó la hipótesis previamente planteada de que la práctica del ejercicio físico era potencialmente dañina para los músculos (Boveris y Chance, 1973). Posteriormente, el objetivo de la investigación sobre el estrés oxidativo durante la actividad física se centró en conocer qué sustancias podían protegernos de este daño, por lo que comenzó a estudiarse el papel de los antioxidantes en la protección de las organelas celulares (Davies y cols., 1982a; Quintanilha y cols., 1982). Así, Jackson y cols. (1983) comprobaron los beneficios de la vitamina E en la reducción del daño muscular causado por el ejercicio físico, y que la depleción de ésta aumentaba la lesión de la membrana muscular (Jackson y cols., 1985). Estos hallazgos obtenidos con vitamina E impulsaron otros estudios

acerca del efecto de la suplementación antioxidante con resultados similares (Kumar y cols., 1992; Kanter y cols., 1993; Goldfarb y cols., 1994).

Hasta ese momento se utilizaron únicamente técnicas para valorar los productos de la peroxidación lipídica (Dillard y cols., 1978; Brady y cols., 1979), aunque Davies, Jackson y sus respectivos colaboradores emplearon también la espectroscopía de resonancia del *spin* (Davies y cols., 1982a; Jackson y cols., 1985). De esta forma, demostraron la liberación de  $\bullet\text{O}_2^-$  por el músculo en contracción (Reid y cols., 1992a y b y 1993), la generación de  $\bullet\text{NO}$  por el músculo esquelético (Balon y Nadler, 1994; Kobzik y cols., 1994) y se detectó la formación de  $\bullet\text{OH}$  en el músculo activo (Diaz y cols., 1994; O'Neill y cols., 1996).

La SOD es una enzima fundamental en la regulación del estado redox de la célula. El efecto del ejercicio en su actividad fue investigado en la década de los 80 (Jenkins y cols., 1984; Higuchi y cols., 1985; Kanter y cols., 1985; Alessio y Goldfarb, 1988). Su capacidad de adaptación al ejercicio, tanto agudo como crónico, sobre todo en las fases iniciales de la recuperación, se ha descrito a nivel del corazón, aparato respiratorio y músculo esquelético (Ji y cols., 1988; Hammeren y cols., 1992; Ji y cols., 1992; Criswell y cols., 1993; Ji, 1993; Powers y cols., 1993, 1994a y b; Tian y cols., 2010).

También se ha estudiado la función antioxidante del glutatión durante el ejercicio. Sus niveles se modificaron durante la actividad física, lo que cambió el estado redox de la célula tras un entrenamiento de resistencia (Sen y cols., 1992 y 1994). Además, se ha observado que la suplementación con antioxidantes previene la oxidación del glutatión sanguíneo (Sastre y cols., 1992).

Más recientemente se ha valorado la función de las EROs producidas en la contracción muscular y cómo el estado redox de la célula es capaz de modular los procesos de señalización celular (Sen, 2001). Gracias a estas aportaciones, se ha abierto un prometedor campo de investigación que tiene por objeto comprobar los cambios en los marcadores de estrés oxidativo y su prevención, además de entender el funcionamiento redox de la célula muscular durante el ejercicio.

### **1.2.3.1. Fuentes de radicales libres durante el ejercicio físico**

Tras exponer las principales fuentes de radicales libres, en una situación en la que se producen cambios tan importantes, como es el caso del ejercicio físico, cabe reseñar los procesos que más influyen en la generación de especies reactivas. Ya en un primer estudio

realizado por Dillard y cols. (1978) se asumió que el músculo es el principal origen de radicales libres durante el ejercicio físico, aunque otros tejidos como el cardiaco, el pulmonar o incluso los leucocitos que infiltran el tejido muscular dañado por el esfuerzo también pueden contribuir significativamente a la producción de EROs.

Varias investigaciones realizadas se han centrado en el análisis de los marcadores de oxidación en sangre periférica, sin tener en cuenta el tipo de ejercicio realizado, obteniéndose, por tanto, resultados contradictorios difíciles de explicar. Se han descrito aumentos de la LPO (Davies y cols., 1982a; Ji y Fu, 1992; Li y cols., 1999; Alessio y cols., 2000; Childs y cols., 2001; Baker y cols., 2004), de la carbonilación proteica (Lamprecht y cols., 2008), daño al ADN (Selman y cols., 2002) o de la rigidez en la membranas celulares (Brzeszczynska y cols., 2008, Berzosa y cols., 2011a). Algunos autores también sugieren que estos incrementos en la producción de EROs son debidos a los cambios metabólicos comunes en todos los programas de ejercicio, como por ejemplo, la liberación de catecolaminas y su autooxidación (Cooper y cols., 2002). Otra posibilidad planteada es que el proceso inflamatorio que sufre la fibra muscular tras el ejercicio, con invasión por macrófagos y otras células fagocíticas, sea el responsable de la sobreproducción de radicales libres. Este proceso es esencial para la regeneración muscular y conlleva una liberación de EROs por parte de estas células, que incluso puede dañar el tejido muscular no lesionado inicialmente por el ejercicio (Zerba y cols., 1990; Butterfield y cols., 2006).

Los mecanismos de producción endógena de radicales libres en el músculo se localizan en varios lugares, siendo las EROs primarias el  $\bullet\text{O}_2^-$  y el  $\bullet\text{NO}$  (Jackson, 2005). Sin duda, una de la fuentes es la mitocondria (Fig. 11), que genera principalmente  $\bullet\text{O}_2^-$  en la cadena de transporte de electrones. Al contrario de la corriente de pensamiento tradicional, recientemente se ha propuesto que ésta no es la principal fuente de radicales libres durante el ejercicio. La mitocondria en estado basal o estado 4 transforma entre un 2% y un 5% del oxígeno que consume en  $\bullet\text{O}_2^-$ , mientras que en su estado más activo (estado 3), estimulado por la cantidad de ADP, transforma en radical superóxido sólo un 0,1% (St-Pierre y cols., 2002). Esto es importante porque, durante el ejercicio, las mitocondrias de los músculos activos se encuentran en este último estado, lo que limita considerablemente su producción de EROs.



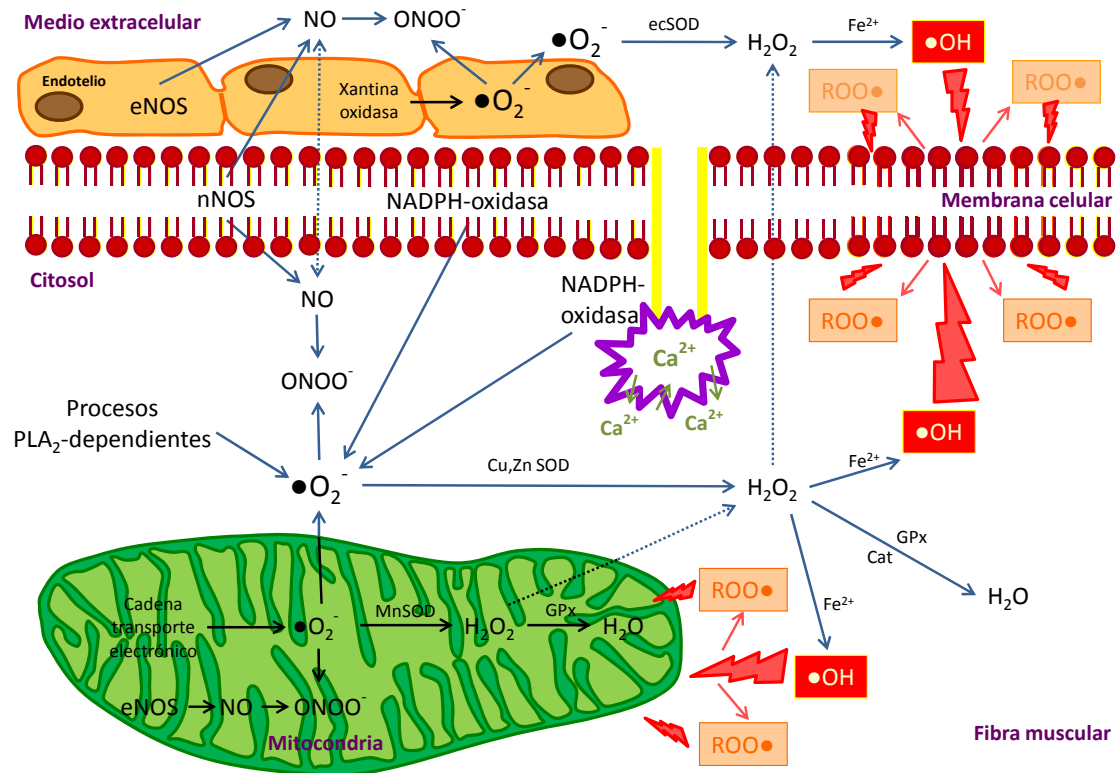


Fig. 11: Principales fuentes de radicales libres y producción de EROs durante el ejercicio.

La producción de radicales libres depende también del tipo de fibra muscular. Las fibras de contracción lenta, o de tipo I, producen de dos a tres veces menos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las de contracción rápida, o de tipo II, sin diferencias entre las actividades de la GPx mitocondrial (Anderson y Neuffer, 2006).

Además de la mitocondria, se generan EROs en otras localizaciones de la fibra muscular donde. En el retículo sarcoplasmático y en los túbulos transversos, éstos se producen mediante la vía enzimática de la NADPH oxidasa (Xia y cols., 2003). Su actividad se ve incrementada con el inicio de la despolarización en el proceso del acoplamiento de excitación-contracción (Espinosa y cols., 2006; Hidalgo y cols., 2006). El •O<sub>2</sub><sup>-</sup> generado influye en la liberación de Ca<sup>2+</sup> (Cherednichenko y cols., 2004), lo que puede influir en la contracción muscular. La reacción catalizada por la NADPH oxidasa también se da en la membrana plasmática de las células musculares, que poseen sistemas redox de intercambio de electrones, lo que repercute en la liberación de radicales libres al espacio extracelular (Javesghani y cols., 2002).

Otra oxidasa involucrada en la generación de las EROs en el ejercicio es la xantina oxidasa. En los periodos de hipoxia, isquemia u otras situaciones de déficit energético,

fenómenos que se dan durante la realización del ejercicio físico, aumenta la producción de radicales libres por esta vía. Así, administrando inhibidores de esta enzima, como el alopurinol o el oxipurinol, disminuyeron los niveles de producción de radicales libres durante el ejercicio (Heunks y cols., 2001; Gómez-Cabrera y cols., 2003).

A nivel de la membrana celular actúa también la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que separa los fosfolípidos de la membrana para liberar ácido araquidónico, un sustrato para la lipooxigenasa. Durante su catálisis genera radicales libres (Zuo y cols., 2004). La activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> estimula la NADPH oxidasa y, a través de ésta, estimula la producción de EROs citosólicos (Gong y cols., 2006) y mitocondriales (Nethery y cols., 2000; Zuo y cols., 2004).

En el músculo, se genera continuamente •NO, sobre todo durante la contracción muscular (Balon y Nadler, 1994; Kobzik y cols., 1994). El músculo esquelético en reposo expresa las isoformas de la NOS neuronal y endotelial. Al principio, se creyó que la primera se expresaba especialmente en las fibras de tipo II y la segunda en la mitocondria (Kobzik y cols., 1995). Contrariamente a esto, se ha demostrado que la isoforma mitocondrial es una variación de la neuronal (Elfering y cols., 2002). La isoforma inducible de la NOS también es expresada por el músculo en periodos de inflamación como los que aparecen tras un ejercicio intenso; sin embargo, la fuente principal de radicales libres es la neuronal (Tidball y cols., 1998; Hirschfield y cols., 2000).

Las fuentes diferentes a las musculares generan alteraciones en el estado redox, causadas principalmente por los fagocitos. Los macrófagos invaden el área muscular dañada (McArdle y cols., 2004), proceso esencial para la reparación celular, aunque puede llegar a dañar el músculo aún sano por aumento de la producción de EROs (Malech y Gallin, 1987; Zerba y cols., 1990). Además, la autooxidación de las catecolaminas y la liberación de hierro procedente de la Hb o la ferritina podrían ampliar las respuestas inflamatorias y, por ende, el estrés oxidativo (Chevion y cols., 2003).

Cabe puntualizar que no se debe hacer una generalización, dado que cada tipo de ejercicio, definido por sus variables de intensidad, duración y tipo de trabajo, promueve distintas respuestas y adaptaciones metabólicas y, por tanto, se produce daño de gravedad variable. Los ejercicios anaeróbicos de intensidad elevada son los que ocasionan una mayor producción de radicales libres. Por ejemplo, los supramáximos realizados durante las series de *sprints* o multisaltos, así como los ejercicios en los que predominan las contracciones excéntricas, ya que provocan una gran respuesta inflamatoria. Por otro lado, durante el ejercicio de baja intensidad, inferior al 50% del VO<sub>2</sub>max, la producción de radicales libres es

muy reducida. Dicho resultado puede responder a que el ejercicio aeróbico estimula el aumento de antioxidantes intracelulares, así como la capacidad enzimática antioxidante, especialmente en las células inmunitarias, reduciendo la vulnerabilidad de los individuos frente al estrés oxidativo (Vasankari y cols., 1997; Dawson y cols., 2002).

### **1.2.3.2. Funciones de los radicales libres en el ejercicio**

Aunque los radicales libres son productos tóxicos originados durante el metabolismo celular, existen evidencias que sugieren que pueden ser necesarios para un adecuado desarrollo de la función celular (Aslan y Ozben, 2003; Chiarugi y cols., 2003; Nathan, 2003). Estos radicales libres contribuyen a la regulación del crecimiento celular y de respuestas adaptativas al poder actuar como moléculas señalizadoras. Por ejemplo, la transducción inducida por el factor de crecimiento, derivado de las plaquetas y la transcripción génica inducida por citoquinas, se inhibe al eliminar radicales libres, tanto por antioxidantes químicos como enzimáticos (Dalle-Donne y cols., 2001).

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

Desde los años 90, varios estudios apuntan que una pequeña cantidad de EROs, como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, desempeña un papel crucial como segundo mensajero en la transducción de la señal para la activación, diferenciación y proliferación celular (Schreck y cols., 1992). Por tanto, la inducción o inhibición de la proliferación celular parece depender de la relación oxidantes/antioxidantes dentro de la célula. Un ambiente reducido estimula la proliferación; sin embargo, uno más oxidado inducen apoptosis o necrosis celular. En líneas generales, un estímulo oxidante puede actuar como mensajero para la proliferación celular, mientras que si éste es muy intenso puede inducir lo contrario: apoptosis o necrosis celular (Fig. 12).



*Fig. 12: Efectos de los radicales libres en la célula. Adaptado de Powers y Jackson, 2008.*

Está demostrado que bajos niveles de EROs son necesarios unos para una producción de fuerza muscular normal (Reid, 2001; Supinski y Callahan, 2007). De hecho, si se alcanza una depleción total de radicales libres en el músculo, mediante el uso de antioxidantes, puede comprometerse la producción de la fuerza máxima (Reid y cols., 1993; Coombes y cols., 2002). Por otra parte, un incremento grande de radicales libres en el músculo contribuye a la fatiga muscular durante el ejercicio. La gran mayoría de los estudios concuerdan en que la acción de los antioxidantes retrasa la aparición de la fatiga muscular durante los ejercicios submáximos (Barclay y Hansel, 1991; Anzueto y cols., 1992; Reid y cols., 1992a; Khawli y Reid, 1994; Moopanar y Allen, 2005; Supinski y Callahan, 2007), aunque este efecto no se produce si el ejercicio es máximo (Reid y cols., 1992a; Matuszczak y cols., 2005). Debido a esto se discute si la suplementación con una dosis alta de antioxidantes mejora el rendimiento en ejercicios de resistencia, con defensores (Funes y cols., 2010) y detractores (Avery y cols., 2003; Bryant y cols., 2003; Powers y cols., 2004; Gaeini y cols., 2006) de esta hipótesis.

El mecanismo que explicaría las diferentes respuestas celulares frente a un mismo estímulo es la respuesta adaptativa, por la cual la exposición a un mismo agente tóxico, en concentraciones subletales, provocaría una respuesta celular protectora, a diferencia de los efectos adversos producidos por él mismo, a concentraciones letales. En este sentido, se ha comprobado que la exposición a bajos niveles de radiación o a oxígeno hiperbárico aumentan las defensas antioxidantes (García Morales, 2007).





## 2. JUSTIFICACIÓN



Es bien sabido que el ejercicio físico regular constituye una actividad preventiva y saludable al reducir el riesgo de aparición de la diabetes, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, entre otros (Blair y cols., 2001). No obstante, en las últimas décadas, numerosos trabajos de investigación han demostrado que la realización del ejercicio físico puede exacerbar el estrés oxidativo (Powers y Jackson, 2008). Para la ejecución de una actividad física se requiere la contracción de los músculos esqueléticos implicados, con el consiguiente aumento del  $VO_2$  respecto al reposo, hecho que conlleva indefectiblemente a una sobreproducción de radicales libres. Por tanto, cabe esperar que el ejercicio intenso y prolongado dañe los componentes celulares por oxidación (Davies y cols., 1982a; Duthie y cols., 1990; Radák y cols., 2001).

La estructura de la membrana celular, constituida por proteínas y lípidos dispuestos en forma de bicapa, es dinámica, ya que sus moléculas se mueven en las dos direcciones de su superficie. Gracias a esta propiedad se modulan numerosas funciones esenciales para la homeostasis celular (Singer y Nicolson, 1972; Stubbs y Smith, 1984; Baenziger y cols., 2000). Pequeñas modificaciones en la composición lipídica de la bicapa alteran sus niveles de fluidez. Por este motivo, la medición de la fluidez de la membrana es un indicador del estado de su función (Li y cols., 1999).

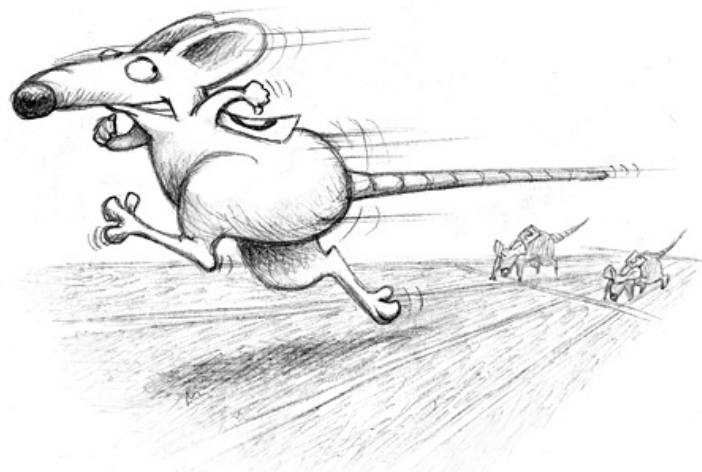
Cuando se produce estrés oxidativo, los radicales libres, al reaccionar con los fosfolípidos y proteínas de la membrana, pueden producir alteraciones como desestructuración, inhibición de los canales iónicos y disfunción de los receptores de membrana. A esta situación oxidativa a la que todo organismo aeróbico se encuentra expuesto, en mayor o menor grado de forma irremediable, se le añade la que induce la actividad física, produciendo un aumento en el consumo del oxígeno en la mitocondria. Esta organela desempeña un papel clave en el metabolismo celular, y es considerada como la principal fuente de radicales libres durante la respiración aeróbica. Una alteración en su funcionamiento puede derivar en la formación de EROs, lo que puede agravar el daño oxidativo producido durante el ejercicio físico (Matsugo y cols., 2000).

Teniendo en cuenta estos hechos, es presumible que las diferencias de la lesión oxidativa generada dependan, por un lado, de las características del ejercicio físico desarrollado *per se*, es decir, de su tipo, intensidad y duración; y, por otro lado, del tejido o muestra biológica sobre el que se realiza el estudio (Nikolaidis y cols., 2008). Es llamativo el escaso número de trabajos científicos que analizan los efectos del ejercicio físico en la fluidez de las membranas biológicas. Por otra parte, sus resultados son contradictorios cuando estudian la fluidez, así como otros indicadores de lesión oxidativa celular.



En consecuencia, se decidió diseñar un estudio que englobara los principales parámetros empleados para la valoración del daño mediado por radicales libres, utilizando una prueba progresiva de esfuerzo agudo hasta la extenuación y un protocolo de entrenamiento submáximo con tres periodos de duración: 1, 4 y 12 semanas. Para este fin, se utilizó como ergómetro un tapiz rodante motorizado con intensidad controlada, por ser éste la instrumentación más empleada en este tipo de estudios y, además, por haberse obtenido los efectos del entrenamiento más consistentes (Wisløff y cols., 2001).

En este trabajo se analizaron membranas aisladas y homogeneizados obtenidos a partir de músculo esquelético y cardiaco, hígado y cerebro de ratas Sprague-Dawley. Los músculos esquelético y cardiaco, en el contexto del ejercicio físico, desempeñan un papel fundamental, ya que sus mitocondrias son la fuente predominante en la generación de EROs (Powers y Jackson, 2008). El hígado es uno de los órganos principales en el metabolismo de los glúcidos, lípidos y proteínas, así como un reservorio de vitaminas y metales (Guyton y Hall, 2006). Finalmente, el cerebro, por su extrema vulnerabilidad a las EROs, puesto que consume el 20% del O<sub>2</sub> total en el organismo, contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a la LPO y, en comparación con otros tejidos, tiene una actividad enzimática antioxidante deficiente (André y cols., 2006; Halliwell, 2006). En cada uno de estos tejidos realizaremos tres determinaciones analíticas: fluidez de membrana, cuantificación de malonildialdehído y 4-hidroxi-alquenoales (MDA + 4-HDA) y valoración de los restos carbonilos proteicos.

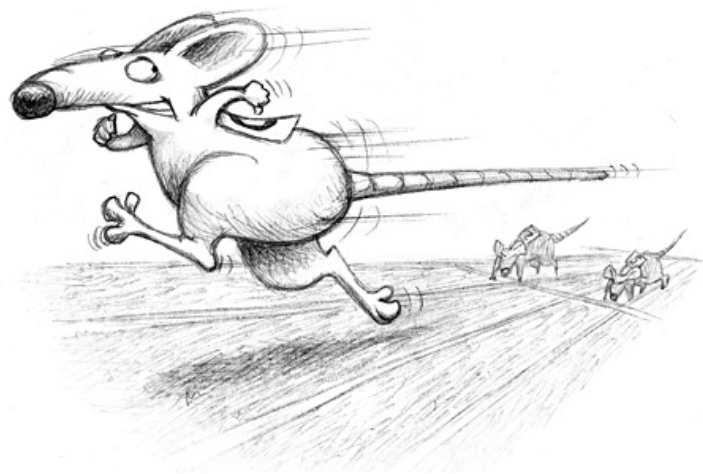


### **3. OBJETIVOS**



- Primero:** Describir los efectos del ejercicio físico, tanto agudo como de entrenamiento, sobre la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales aisladas a partir de músculo esquelético, cardíaco, hígado y cerebro de la rata, distribuidas en los grupos control, ejercicio agudo y entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas de duración.
- Segundo:** Analizar en los tejidos mencionados en el objetivo anterior las concentraciones de malonildialdehído y 4-hidroxi-alquenos, como indicadores de la lesión oxidativa producida en los lípidos, en los grupos citados.
- Tercero:** Determinar el grado de carbonilación proteica, un indicador de lesión oxidativa mediada por radicales libres en las proteínas tisulares, en todos los tejidos y grupos de ejercicio estudiados.
- Cuarto:** Analizar la influencia de la lesión oxidativa a lípidos y proteínas sobre los daños que se originen en la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales, en todos los tejidos estudiados de los grupos de reposo y ejercicio.
- Quinto:** Comparar las diferencias existentes en cuanto a los resultados de fluidez y de daño oxidativo lipídico y proteico, en función del tipo de protocolo ergométrico realizado: ejercicio agudo y entrenamientos de diferente duración.





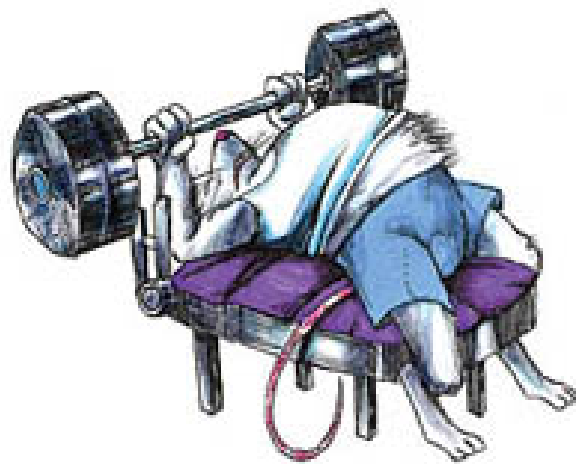
### **3. AIMS**



- First:** To describe physical exercise effects, as acute as training, on cell and mitochondrial membrane fluidity, isolated from tissues: skeletal and cardiac muscles, liver and brain, in control, acute exercise, and 1, 4 and 12 weeks training groups.
- Second:** To analyze on first aim tissues the malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals concentrations, as lipid peroxidation index, in the experimental groups above mentioned.
- Third:** To determine the protein carbonylation level, a free radical-mediated oxidative injury marker on proteins, in all tissues and exercise groups.
- Fourth:** To analyze lipid and protein oxidative injury influence on cell and mitochondrial membranes fluidity in every tissues of each group.
- Fifth:** To compare the existing differences as regards fluidity and lipid and protein oxidative damage results, according to the kind of the ergometric protocol: acute exercise and trainings of different duration.







## 4. MATERIAL Y MÉTODOS



## 4.1. ANIMALES

Se adquirieron 50 ratas macho de la raza Sprague-Dawley en Harlan-Ibérica (Barcelona, España), con un peso medio de  $342 \pm 23$  g. En este trabajo sólo se incluyeron ratas machos para evitar cualquier distorsión en la respuesta al ejercicio mediada por el ciclo ovárico. Los animales se estabularon en las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, permaneciendo 2 ratas en cada jaula, con la temperatura ambiental regulada automáticamente a  $22 \pm 1$  °C y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, iniciando la fase oscura a las 08:00 h y la fase de luz a las 20:00 h, con el fin de simular un horario de actividad máxima. Tuvieron disponibilidad de agua y alimentación *ad libitum* (dieta de mantenimiento para roedores, Harlan-Ibérica, tipo RMM).

Todas las manipulaciones animales y el procedimiento experimental se realizaron por las mañanas en una habitación termorregulada aislada, preparada para simular una situación de oscuridad utilizando luz roja y cubriendo las entradas de luz natural (Fig. 13). Para efectuar el transporte entre las habitaciones de alojamiento y de experimentación, las jaulas fueron introducidas en compartimentos opacos para evitar la exposición a la luz ambiental. 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). El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Zaragoza (ref. PI47/08).



*Fig. 13: Equipo ergométrico empleado en la habitación habilitada para los protocolos de ejercicio, en situación de luz natural (izquierda) y simulando la situación de oscuridad con el uso de luz roja (derecha).*

## 4.2. MATERIALES

### 4.2.1. Material de laboratorio

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios del grupo de investigación consolidado del Gobierno de Aragón “Fisiología del envejecimiento y del estrés oxidativo (B40)”, situados en el Área de Fisiología del Departamento de Farmacología y Fisiología, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Están equipados, entre otros, con el siguiente utillaje empleado en el transcurso de esta investigación:

- Agitadores: vórtex Velp Scientifica<sup>®</sup> Zx<sup>3</sup> y vórtex Heidolph<sup>®</sup> REAX 2000.
- Balanzas de precisión Cobos<sup>®</sup> CBH-300J y A-220 CB.
- Baño termostatzado con agitación Bunsen<sup>®</sup> BTG-1.
- 2 centrifugas Beckman<sup>®</sup> Avanti 30<sup>TM</sup>, refrigeradas y equipadas con dos rotores: F1010 para 10 tubos de 10 mL, y F3602 para 36 tubos Eppendorf de 1,5 y 2 mL.
- Espectrofotómetro Beckman-Coulter<sup>®</sup> DU800, con dos tipos de cubetas: desechables de plástico para medir en el rango visible, y de cuarzo para medir en el rango ultravioleta (UV).
- Espectroscopio de fluorescencia Perkin-Elmer<sup>®</sup> LS-55, equipado con un accesorio de polarización con cubetas de cuarzo y un accesorio de microagitación de la muestra presente en la cubeta. Este aparato va acompañado de un baño recirculante Selecta<sup>®</sup> Frigiterm.
- Homogeneizador de teflón acoplado a un rotor Heidolph<sup>®</sup> RZR 2020.
- Homogeneizador Ultra-Turrax Janke & Kunkel<sup>®</sup> T25.
- pHmetro Crison<sup>®</sup> micro pH 2001, equipado con sonda de temperatura.
- Pipetas de precisión, dos juegos: Gilson<sup>®</sup> (P-20, P-200, P-1000 y P-5000) y Eppendorf<sup>®</sup> (0,5-10, 10-100 y 100-1000 µL).
- Pipeta multidispensadora BibbyStep<sup>®</sup> con puntas Eppendorf<sup>®</sup> de 2,5, 5 y 50 mL.
- Sistemas de agua de Millipore<sup>®</sup>: destilada MilliRX y ultrapura MilliQ.
- Frigorífico con nevera (4 °C) y congelador (-20 °C) Liebherr<sup>®</sup> Premium.

- Ultracongelador (-80 °C) Sanyo<sup>®</sup> MDF-U5386S.
- Máquina automática pica-hielo Bar Line<sup>®</sup>.
- Guillotina para sacrificio de las ratas.
- Material quirúrgico diverso para la extracción de tejidos: guantes, bisturí, tijeras, pinzas.
- Otros materiales de tipo fungible, suero fisiológico, viales, papel de filtro, etc.

## 4.2.2. Reactivos químicos

Los reactivos químicos utilizados fueron de la mayor pureza disponible, y se conservaron según las condiciones óptimas indicadas por el comerciante. A continuación, aparecen clasificados con relación al método en el que se utilizaron, indicando los fabricantes donde se adquirieron y el número de catálogo.

### Preparación tisular:

- Panreac<sup>®</sup>: suero fisiológico, salino al 0,9% (NaCl, ref. 121659).
- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>: ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico (HEPES, ref. H-3375); tris(hidroximetil)aminometano (TRIS, ref. T-1503).

### Valoración de la fluidez de membrana:

- Molecular Probes<sup>®</sup>: 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-*p*-tolueno sulfonato (TMA-DPH, ref. T-204).
- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>: tetrahidrofurano (THF, ref. 27038-5).

### Cuantificación de la peroxidación lipídica:

- Panreac<sup>®</sup>: acetonitrilo (ref. 221831); ácido clorhídrico (HCl, ref. 131020); metanol (ref. 131091).
- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>: ácido metanosulfónico (ref. 47135-6); 1-metil-2-fenilindol (ref. M-1164); 1,1,3,3-tetrametoxipropano (ref. T-1642); TRIS (ref. T-1503).

### **Cuantificación de los restos carbonilo:**

- Panreac<sup>®</sup>: etanol (ref. 131086).
- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>: 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, ref. D-2630); ácido tricloroacético (TCA, ref. T9159-500G); guanidina (ref. 17725-3); acetato de etilo (ref. 270520).

### **Determinación de la concentración de proteínas:**

- Bio-Rad<sup>®</sup>: reactivo de Bradford (ref. 500-0006).
- Sigma-Aldrich<sup>®</sup>: albúmina sérica bovina (BSA, ref. A-7848); TRIS (ref. T-1503).

El NaCl, la BSA, la guanidina, la DNPH, el TCA y el TRIS se disolvieron en agua ultrapura obtenida con el sistema MilliQ. Estas disoluciones se prepararon semanalmente, siendo almacenadas en botellas de vidrio color ámbar en una nevera a 4 °C, excepto la DNPH, que se almacenó a temperatura ambiente y en oscuridad. El 1-metil-2-fenilindol se disolvió en acetonitrilo y se mantuvo en nevera a 4 °C.

El 1,1,3,3-tetrametoxipropano se disolvió en tampón TRIS 0,02 M (pH 7,4). El TMA-DPH fue disuelto en una dilución de THF y agua ultrapura 1:1, v/v. Ambos reactivos se prepararon el mismo día del experimento, justo antes de ser utilizados.

## 4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 4.3.1. Grupos de estudio

Se establecieron cinco grupos de trabajo ( $n = 10$  ratas/grupo): control (grupo 1), ejercicio agudo (grupo 2) y tres grupos de entrenamiento, de 1, 4 y 12 semanas (grupos 3, 4 y 5, respectivamente), siendo aleatoria la distribución de los animales en los 5 grupos.

Todas las ratas, exceptuando las del grupo control, realizaron una ergometría de tipo máximo. El objetivo de esta prueba fue doble: por una parte, constituir el test ergométrico de esfuerzo físico agudo realizado por el grupo 2; y por otra, permitir valorar la capacidad física en los grupos de entrenamiento (3-5), en los que únicamente varió la duración del mismo (1, 4 ó 12 semanas). El cálculo de la capacidad física de estos animales fue un requisito esencial para poder precisar la carga de trabajo que desarrollaría cada animal en las sesiones de entrenamiento.

### 4.3.2. Equipo ergométrico

Para los estudios de esfuerzo agudo, se utilizó un tapiz rodante para rata de una sola calle (Panlab<sup>®</sup>), con una rejilla electrificada en su parte posterior. Éste está adaptado para poder realizar mediciones metabólicas mediante el *Oxylet system* (Panlab<sup>®</sup>), el cual consta de: una unidad de control del flujo aéreo (LE 400-4FL, Panlab<sup>®</sup>), para garantizar un flujo constante de aire dentro de la cámara metabólica; un analizador de gases (LE 405, Panlab<sup>®</sup>); y un ordenador tipo PC, con el cual, mediante el paquete informático *Metabolism 2.0* (Panlab<sup>®</sup>), se pudo calcular el  $VO_2$ , producción de anhídrido carbónico y el cociente respiratorio (Fig. 14). Los entrenamientos se realizaron en un tapiz rodante para rata de cinco calles (Panlab<sup>®</sup>) (Fig. 15).



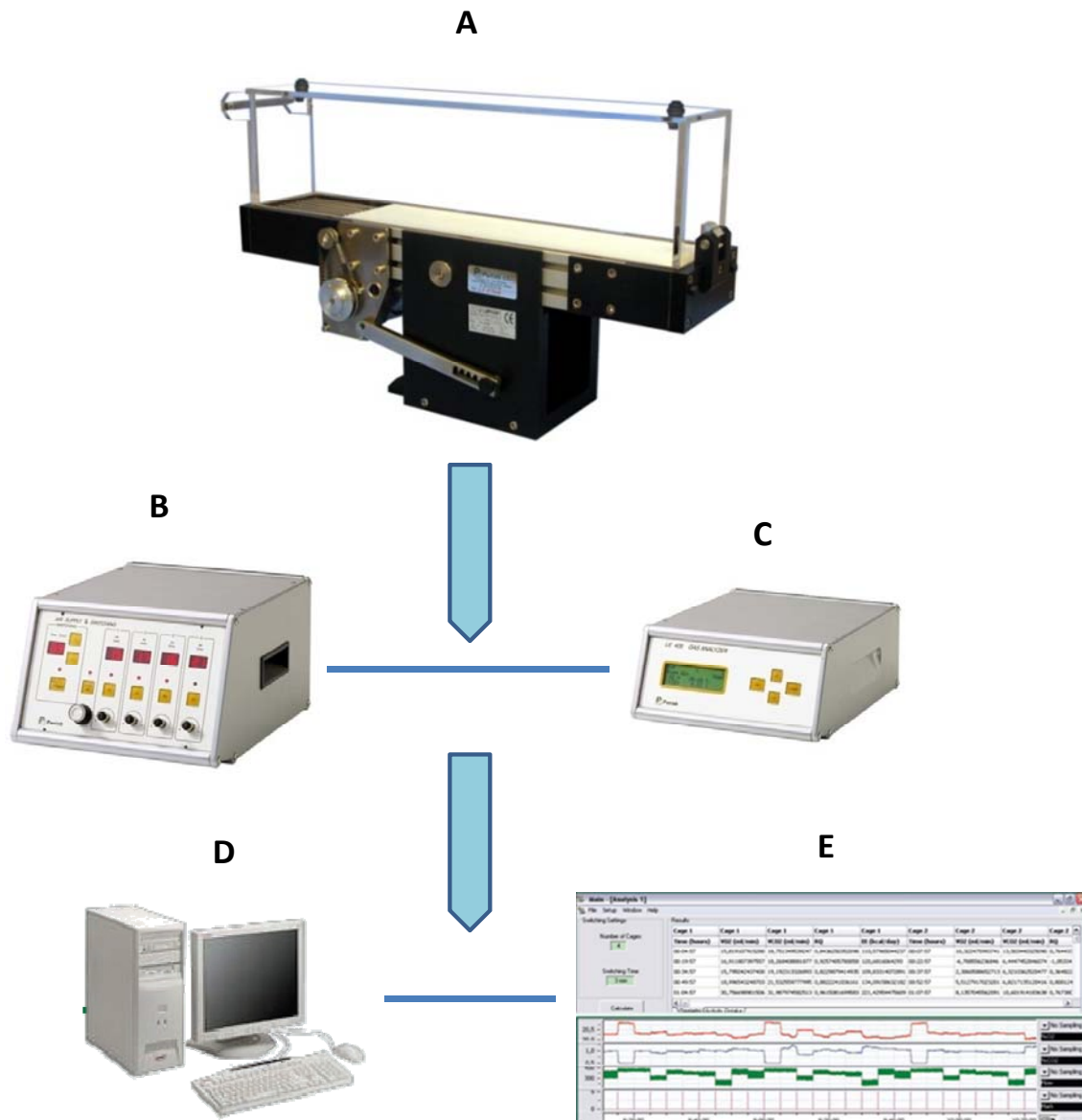


Fig. 14: El equipo instrumental ergométrico utilizado en las pruebas de esfuerzo agudo consta de: A, tapiz rodante para rata de 1 calle adaptado con cámara metabólica; B, unidad de control del flujo aéreo (LE 400-4FL); C, analizador de gases (LE 405); D, ordenador PC. E, imagen tomada del software Metabolism 2.0 durante una ergometría.



*Fig. 15: Ergómetro para rata de cinco calles utilizado para los entrenamientos de los animales (A). Obsérvese a más detalle las cinco calles ocupadas por las ratas (B) y la rejilla, situada en la parte inferior de la imagen, que suministra una mínima descarga eléctrica controlada, suficiente para evitar que el animal se quede quieto durante el desarrollo de la prueba.*

### 4.3.3. Prueba de esfuerzo máximo (Protocolo ergométrico de ejercicio agudo)

Durante la semana anterior a esta prueba ergométrica, los animales fueron sometidos a un protocolo de adaptación al tapiz durante 5 días, a razón de 1 h/día. De esta forma, las ratas se desplazaron dentro del tapiz de entrenamiento, a velocidad constante sin desarrollar un ritmo de carrera (0,10-0,12 m/s). Todas las ergometrías se realizaron entre las 10 y las 12 h de la mañana.

La prueba ergométrica de ejercicio agudo se inició con una velocidad de 0,15 m/s y una inclinación del tapiz de  $10^\circ$ , y se fue incrementando en 0,03 m/s cada 3 minutos (Wisløff y cols., 2001) (Fig. 16). El criterio de maximalidad que señaló el final de la ergometría fue la aparición de fatiga evidente en las ratas, atendiendo a su incapacidad para correr sobre el tapiz rodante a pesar del estímulo eléctrico (Caillaud y cols., 1999). Para éste, se utilizó 0,2 mA como intensidad inicial (la mínima permitida por el equipo ergométrico) y 0,4 mA como máxima al finalizar la prueba.

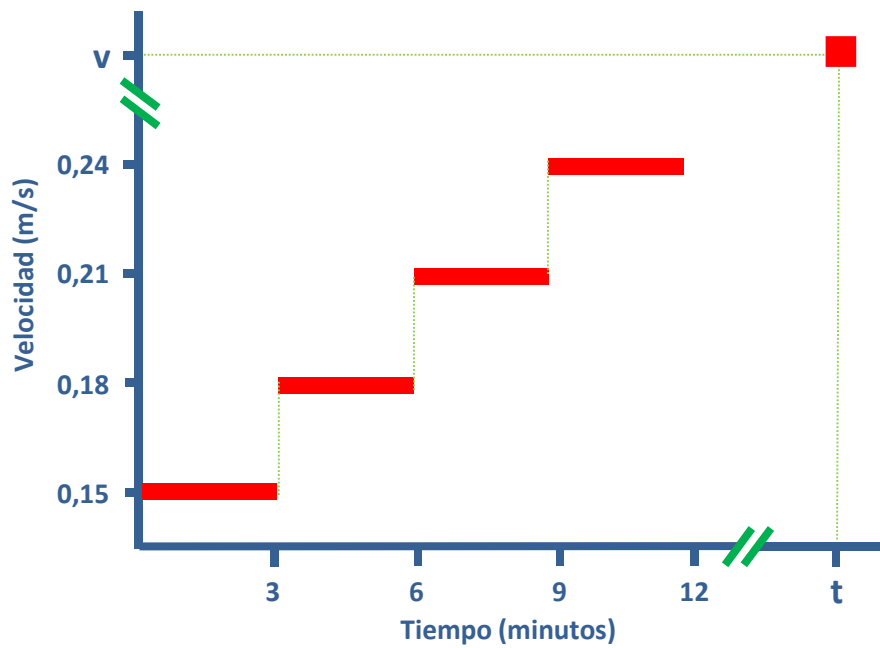
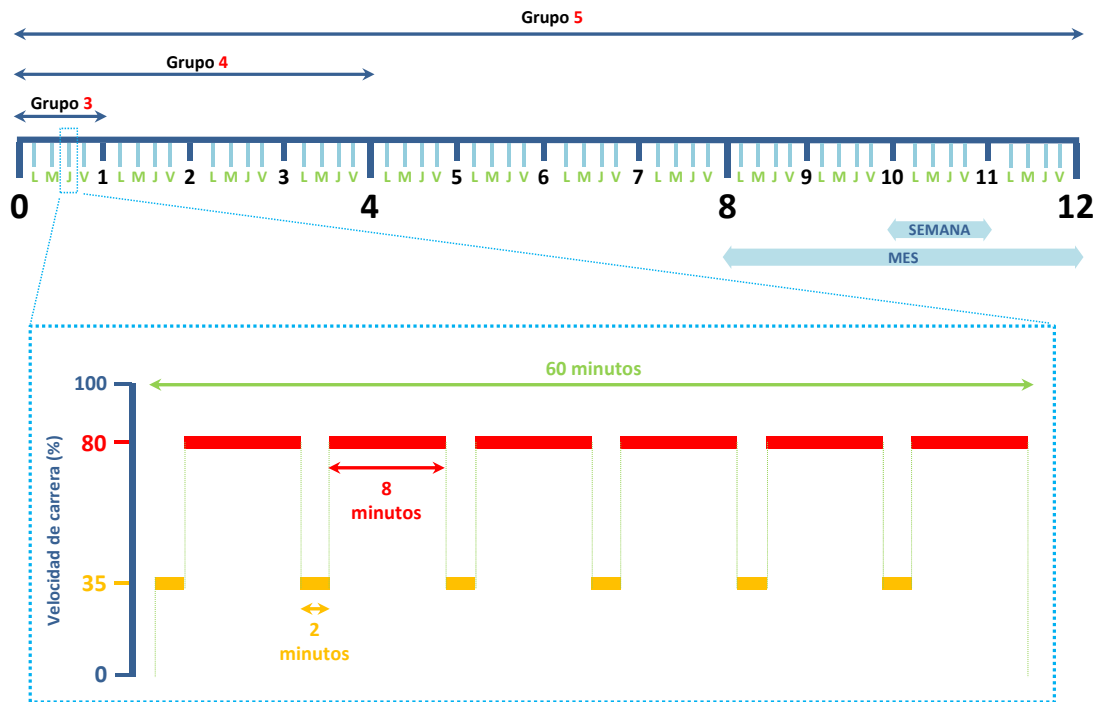


Fig. 16: Protocolo de la prueba de esfuerzo máxima, adaptado de Wisløff y cols., 2001.

#### 4.3.4. Programas de entrenamiento

Se realizó en el tapiz rodante de cinco calles con rejilla de estimulación eléctrica y sin adaptación para realizar medición metabólica. La duración del entrenamiento fue de 1, 4 y 12 semanas (grupos 3-5), con lo que fue necesario distribuir a las ratas en dos subgrupos de 5 animales atendiendo a un criterio de similitud de su capacidad física, calculada previamente en la ergometría de tipo máximo, es decir, un subgrupo con las cinco ratas con mayor rendimiento y otro con las de menor.

Cada semana, las ratas realizaron 4 sesiones de ejercicio, lunes, martes, jueves y viernes, de 60 minutos de duración. En éstas, el ejercicio consistió en una carrera en el tapiz en la que se alternaron dos fases de diferente intensidad, durante seis ciclos consecutivos. En la primera fase, la velocidad del tapiz fue del 35% de la alcanzada cuando el  $VO_2$  de la rata fue máximo, y su duración fue de 2 minutos. A continuación, en la segunda, la velocidad de la cinta aumentó hasta el 80% de la máxima y se mantuvo durante 8 minutos (Fig. 18). La inclinación del tapiz durante todo el entrenamiento fue de  $10^\circ$ . Todos los entrenamientos se realizaron entre las 10 y 14 horas.



*Fig. 17: Planificación del entrenamiento para los grupos de ratas 3, 4 y 5 (entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas, respectivamente). Se detalla el protocolo de una sesión diaria de entrenamiento de 60 minutos de duración, alternando 6 ciclos de 2 minutos al 35% de la velocidad máxima alcanzada en la ergometría aguda y 8 minutos al 80%.*

El grupo 5, que entrenó durante 12 semanas, realizó una segunda ergometría aguda a mitad del periodo de entrenamiento, teniendo en cuenta el periodo prolongado de entrenamiento y la consecuente habituación de las ratas, para modificar ligeramente las cargas de trabajo inicialmente calculadas.

### **4.3.5. Procesamiento de muestras**

Para evitar la posible influencia del ritmo circadiano sobre la realización de la actividad física y el estrés oxidativo, todas las extracciones tisulares se realizaron entre las 10 y las 12 h de la mañana. Las ratas del grupo agudo se sacrificaron inmediatamente después de realizar la ergometría, mientras que las entrenadas el día siguiente del último entrenamiento, para evitar el efecto del ejercicio agudo de la última sesión. Se utilizó la decapitación como método de sacrificio. Los tejidos extraídos de cada rata fueron músculo esquelético, corazón, hígado y cerebro. El músculo esquelético se obtuvo del cuádriceps femoral de las extremidades posteriores. Corazón e hígado se extrajeron tras toracotomía en U y laparotomía media, respectivamente. El cerebro se extrajo por apertura de la cavidad craneal a través de la calota. Todas las muestras tisulares fueron lavadas con suero fisiológico a 4 °C. Los tejidos se secaron en papel de filtro para eliminar el suero de lavado y a continuación se almacenaron a -80 °C hasta el día del análisis.

## 4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.4.1. Aislamiento de membranas

Previamente a la determinación de la fluidez, fue necesario proceder al aislamiento de las membranas celulares y mitocondriales. Para ello, en músculo esquelético y cardíaco y en tejido hepático se utilizó la metodología descrita por Graham (1997) con ligeras modificaciones. En el cerebro, las membranas celulares y mitocondriales se aislaron según el protocolo descrito en Millán-Plano y cols. (2003). Todos estos métodos se fundamentan en centrifugaciones sucesivas a distintas velocidades y tiempos.

#### 4.4.1.1. Tejido muscular e hígado

Tras pesar los tejidos, éstos fueron troceados con un bisturí sobre una placa de Petri situada en hielo y a continuación se introdujeron en un homogeneizador de vidrio con teflón acoplado a un rotor Heidolph® RZR 2020 con tampón HEPES 0,02 M – KCl 0,14 M (pH 7,4) y se homogeneizaron a 1650 rpm. Todo este proceso se realizó en frío.

El homogeneizado tisular se centrifugó a 1000  $xg$  durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos de tejido sólidos y los núcleos celulares. A continuación, el sobrenadante se centrifugó a 50000  $xg$  durante 20 min a 4 °C. El precipitado, que contenía las membranas, se resuspendió en HEPES, se homogeneizó y se volvió a centrifugar a 10000  $xg$  durante 10 min a 4 °C. Tras esta centrifugación, se procedió de la siguiente manera: 1) el sobrenadante y el *buffy coat* se resuspendieron y centrifugaron a 50000  $xg$  durante 20 min a 4 °C, para obtener membranas plasmáticas; y 2) el precipitado se resuspendió en HEPES y se centrifugó a 10000  $xg$  durante 10 min a 4 °C, para obtener las mitocondrias. Ambos precipitados finales, membranas celulares y mitocondrias, se resuspendieron en TRIS 0,05 M (pH 7,4), se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta la realización de los ensayos. La Fig. 19 ilustra este procedimiento.

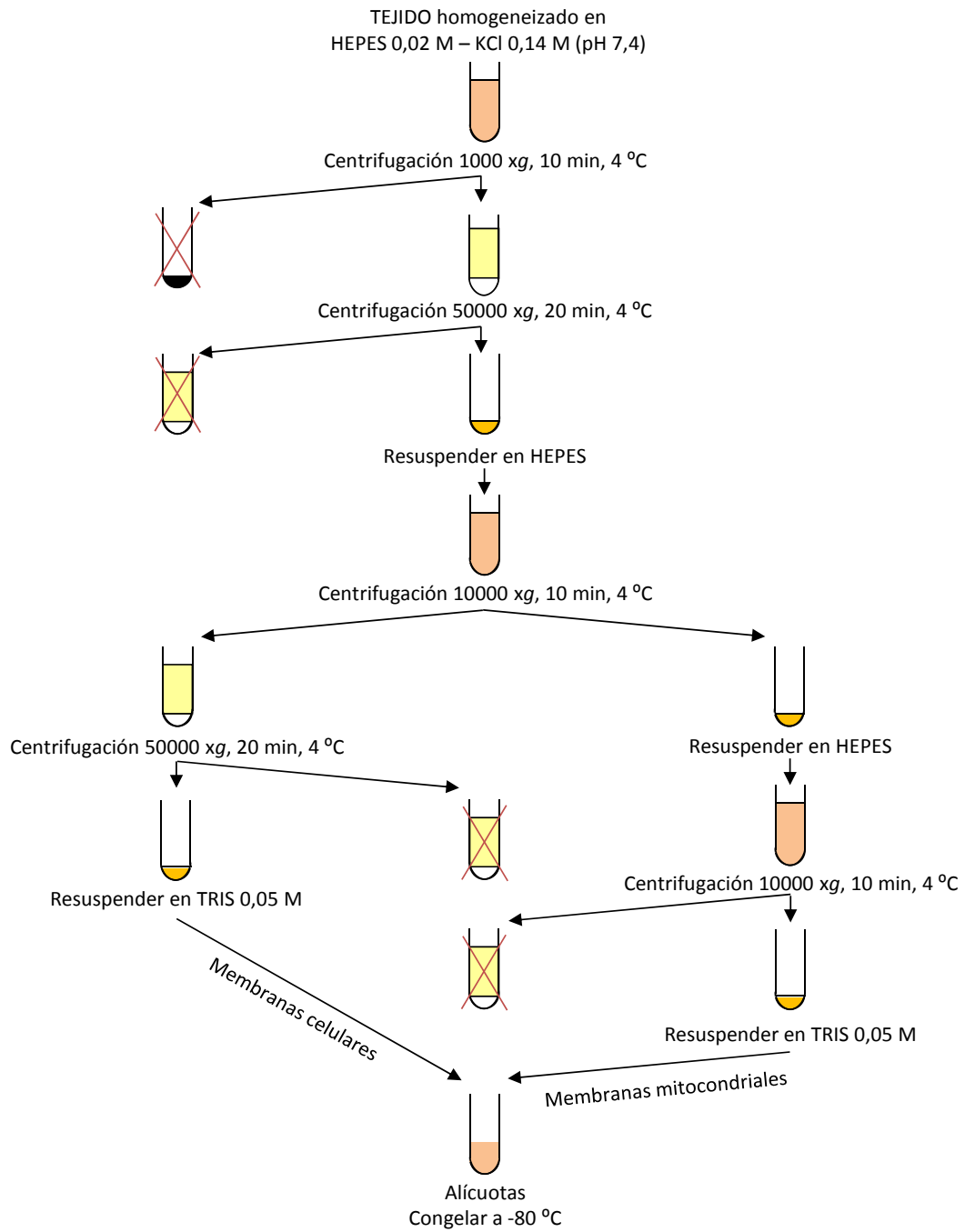


Fig. 18: Protocolo de aislamiento de membranas a partir de músculo esquelético, cardíaco e hígado.

#### 4.4.1.2. Tejido nervioso

El tejido cerebral (Fig. 20) troceado fue homogeneizado a 4 °C en sacarosa 0,32 M. El homogeneizado resultante se centrifugó a 1000 *xg* durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos de tejido no homogeneizados y los núcleos celulares. A continuación, el sobrenadante se centrifugó a 30000 *xg* durante 20 min a 4 °C. El precipitado, que contenía las membranas, se resuspendió en agua ultrapura, se homogeneizó y se volvió a centrifugar a 8000 *xg* durante 20 min a 4 °C. A continuación: 1) se recogieron el sobrenadante y el *buffy coat*, se resuspendieron y se centrifugaron a 48000 *xg* durante 20 min a 4 °C, para obtener sinaptosomas; y 2) el precipitado se resuspendió en agua ultrapura y se centrifugó a 8000 *xg* durante 20 min a 4 °C, para obtener así las mitocondrias.

Los precipitados finales, sinaptosomas y mitocondrias, fueron resuspendidos en TRIS 0,05 M (pH 7,4) y distribuidos en alícuotas que se almacenaron a -80 °C hasta el día del ensayo.



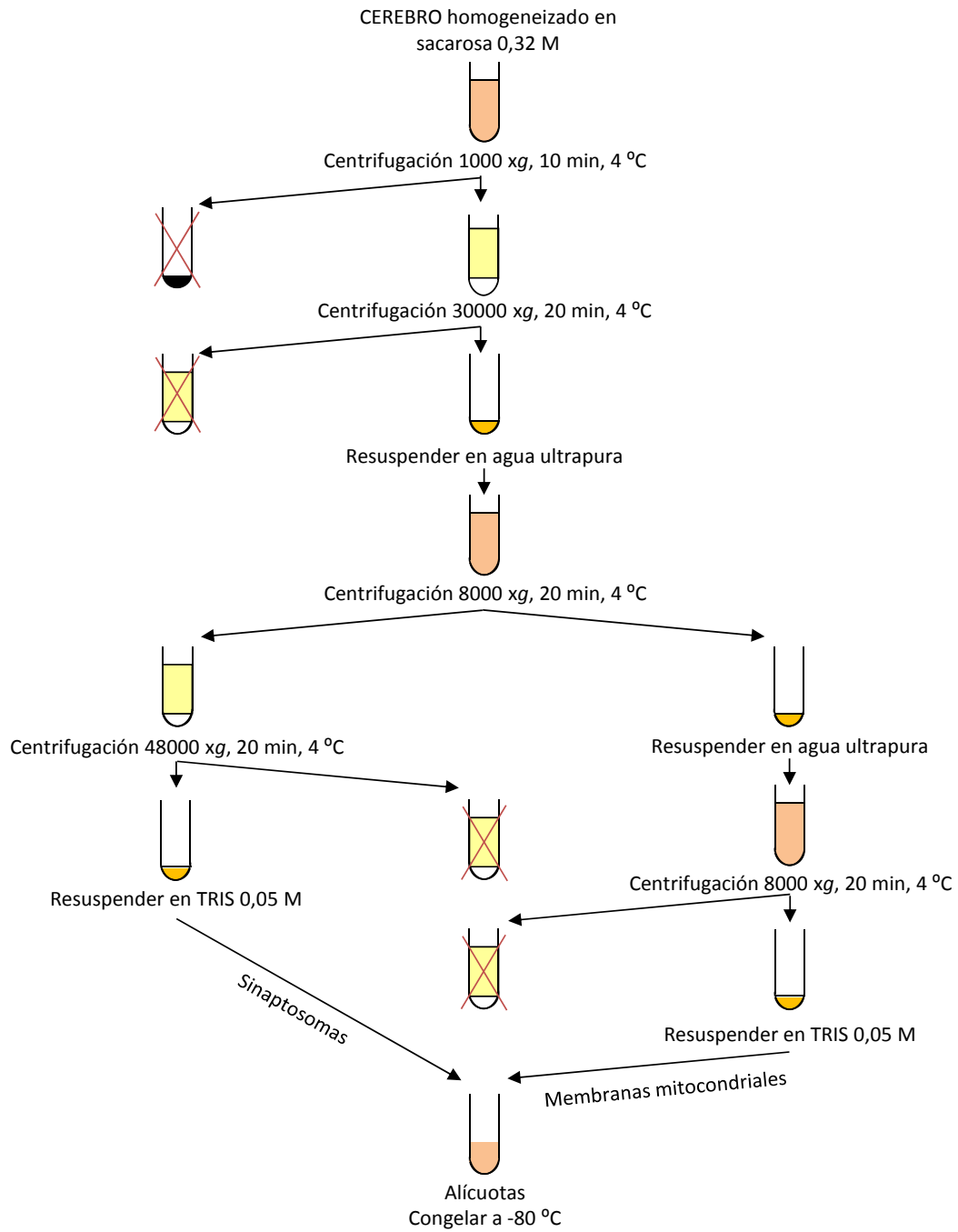


Fig. 19: Protocolo de aislamiento de membranas a partir de cerebro.

## 4.4.2. Valoración de la fluidez de membrana

La fluidez de las membranas celulares y mitocondriales de los cuatro tejidos analizados se monitorizó por triplicado mediante espectroscopía de fluorescencia, usando TMA-DPH como marcador fluorescente (Yu y cols., 1992). El método (Fig. 21) se basa en la inclusión de esta molécula en las membranas, intercalándose entre los fosfolípidos de la bicapa y reflejando, de forma indirecta, la dinámica lipídica, ya que, cuando es iluminado, emite una señal fluorescente (Zimmer y cols., 1993).

### Protocolo:

- ✓ En un tubo se dispensan 0,5 mg/mL de proteína de membranas, calculados por el método de Bradford, que se describirá más adelante.
- ✓ Añadir 8 µL de TMA-DPH 25 µM.
- ✓ Añadir tampón TRIS 0,05 M hasta completar 3 mL/tubo y agitar vigorosamente.
- ✓ Incubar durante 30 min a 37 °C con agitación.
- ✓ Colocar los tubos en baño de agua a temperatura ambiente hasta su lectura.
- ✓ Agitar para resuspender las membranas.
- ✓ Lectura en el espectroscopio de fluorescencia a 360 nm de excitación y 430 nm de emisión.
- ✓ Calcular la polarización (P) según la ecuación:

$$P = \frac{IV_V - GIV_H}{IV_V + GIV_H}$$

donde I es la intensidad de emisión de la luz polarizada verticalmente, medida por un detector orientado en paralelo ( $IV_V$ ) o perpendicular ( $IV_H$ ) al plano de excitación, y G es un factor de corrección para el sistema óptico.

El resultado se calculó por la media aritmética de 30 mediciones independientes, y la fluidez en las membranas se expresó como el inverso de la polarización (1/P) (Yu y cols., 1992; Lee y cols., 1999).

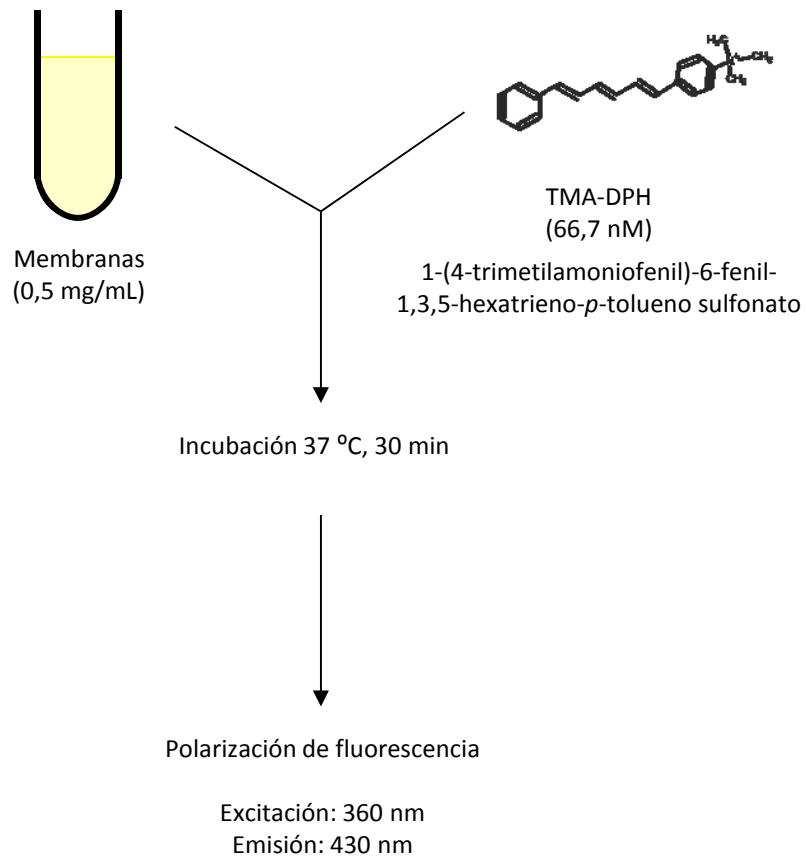


Fig. 20: Protocolo de medición de la polarización en las membranas.

### 4.4.3. Cuantificación del MDA + 4-HDA

La acción de los radicales libres sobre los lípidos de las membranas celulares tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, provocando su peroxidación. Los productos finales de este proceso de LPO son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, siendo mayoritarios el MDA y los 4-HDA. Por tanto, la concentración de MDA + 4-HDA es un indicador del grado de peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas (Janero, 1990). Las concentraciones de MDA + 4-HDA se determinaron por un método colorimétrico (Esterbauer y Cheeseman, 1990), basado en la reacción de un reactivo cromógeno, el N-metil-2-fenilindol, con el MDA o con los 4-HDA, a una temperatura de 45 °C. La condensación de una molécula de MDA ó 4-HDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico, presenta una absorbancia máxima de 586 nm (Fig. 22).

Para obtener la recta de calibrado, se utilizaron diluciones de concentración conocida (0-10 µM), a partir de una disolución de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 0,01 M en tampón TRIS 0,02 M. Al hidrolizarse, el 1,1,3,3-tetrametoxipropano libera MDA de forma estequiométrica (Nielsen y cols., 1997). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Las concentraciones de MDA + 4-HDA se corrigieron por las proteínas, expresándose en nmol MDA + 4-HDA/mg proteína.

#### Protocolo:

- ✓ Homogeneizar las muestras tisulares en TRIS 0,02 M en una preparación 1/10 peso/volumen.
- ✓ Centrifugar el homogeneizado a 3000 xg durante 10 min a 4 °C.
- ✓ Dispensar 2 alícuotas de 200 µL del sobrenadante y añadir 650 µL de N-metil-2-fenilindol 10,3 mM disuelto en acetonitrilo y metanol, con relación 3:1 (v/v).
- ✓ Agitar y dispensar 150 µL de ácido metanosulfónico 15,4 M.
- ✓ Incubar los tubos durante 40 min a 45 °C.
- ✓ Centrifugar a 3000 xg durante 10 min a 4 °C.
- ✓ Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
- ✓ Medir la absorbancia a 586 nm en el espectrofotómetro.

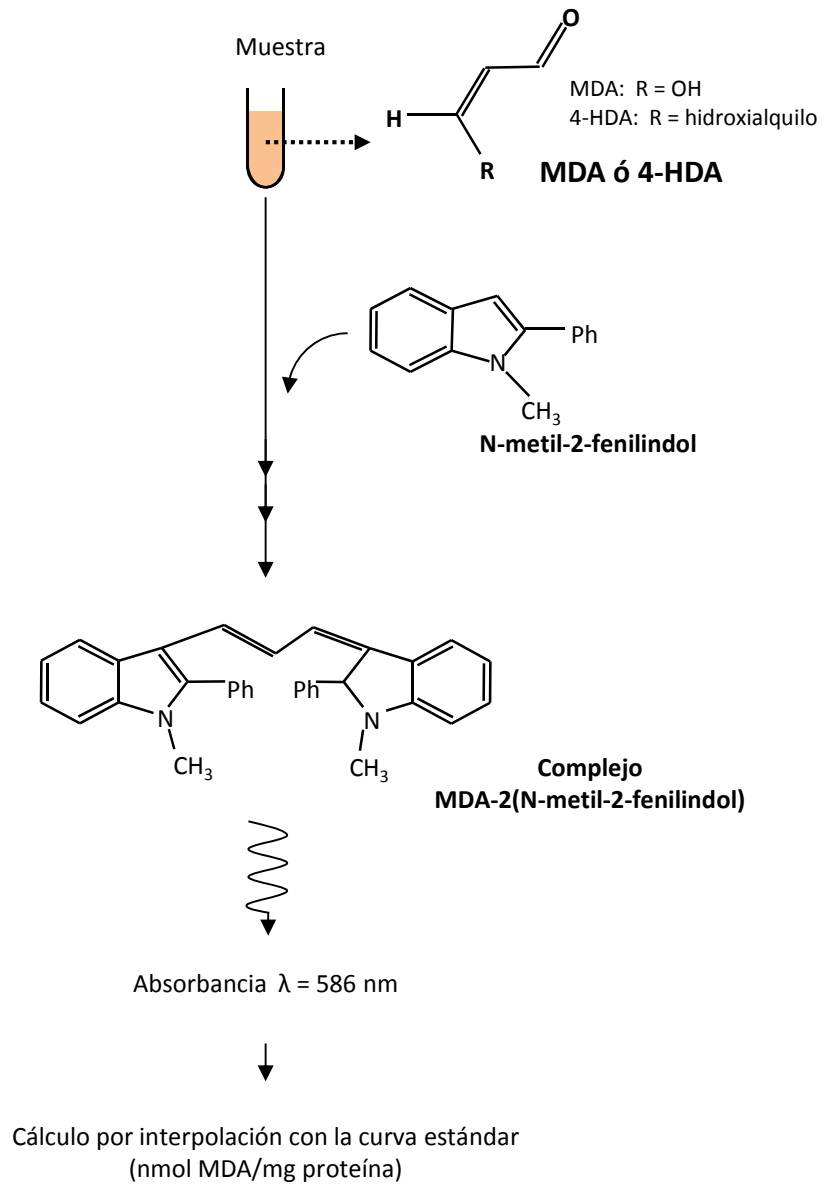


Fig. 21: Protocolo de cuantificación de MDA + 4-HDA.

#### 4.4.4. Valoración de la carbonilación proteica

Para valorar el daño oxidativo a las proteínas de los homogeneizados, se utilizó la determinación de los restos carbonilo de las proteínas (Davies y Goldberg, 1987; Dean y cols., 1997). Para ello, se siguió el protocolo analítico descrito por Levine y cols. (1990), con modificaciones mínimas. Este método está basado en la reacción de los restos carbonilo de las proteínas con la DNPH, formándose un derivado que presenta máxima absorbancia en el rango de 360-390 nm. Durante el procedimiento se utilizaron sucesivamente el TCA para la precipitación de las proteínas, los lavados para la eliminación del exceso de DNPH que no ha reaccionado con los restos carbonilo, y la guanidina, para redissolver las proteínas y, así, poder realizar la lectura en el espectrofotómetro (Fig. 23).

La concentración de restos carbonilo se calculó a partir de la absorbancia obtenida aplicando la Ley de Beer-Lambert y el coeficiente de absorción molar de la DNPH ( $\epsilon=22000 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Se utilizó como blanco una disolución de guanidina 6 M. Finalmente, tras la determinación de las proteínas totales, los resultados se expresaron en nmol de restos carbonilo/mg de proteínas totales.

##### Protocolo:

- ✓ 0,3 g de tejido se homogeneizaron en 1,2 mL de TRIS 0,5 M (pH 7,4).
- ✓ A 1 mL de los homogeneizados, añadir 100  $\mu\text{L}$  de tampón TRIS 0,02 M (pH 7,4) y 200  $\mu\text{L}$  de DNPH 0,01 M en HCl 2N.
- ✓ Agitar e incubar durante 1 h a 37 °C.
- ✓ Dispensar 325  $\mu\text{L}$  de TCA 50% frío e incubar en hielo durante 10 min.
- ✓ Centrifugar a 3000  $\times g$  durante 10 min a 4 °C.
- ✓ Lavar el precipitado tres veces, resuspendiendo con 1 mL de etanol:acetato de etilo 1:1, v/v, y centrifugando a 11000  $\times g$  durante 3 min a 4 °C.
- ✓ Disolver el precipitado final en 700  $\mu\text{L}$  de guanidina-HCl 6 M (pH 2,0).
- ✓ Agitar e incubar durante 15 min a 37 °C.
- ✓ Centrifugar a 12000  $\times g$  durante 10 min a 4 °C.
- ✓ Leer la absorbancia del sobrenadante a 375 nm.

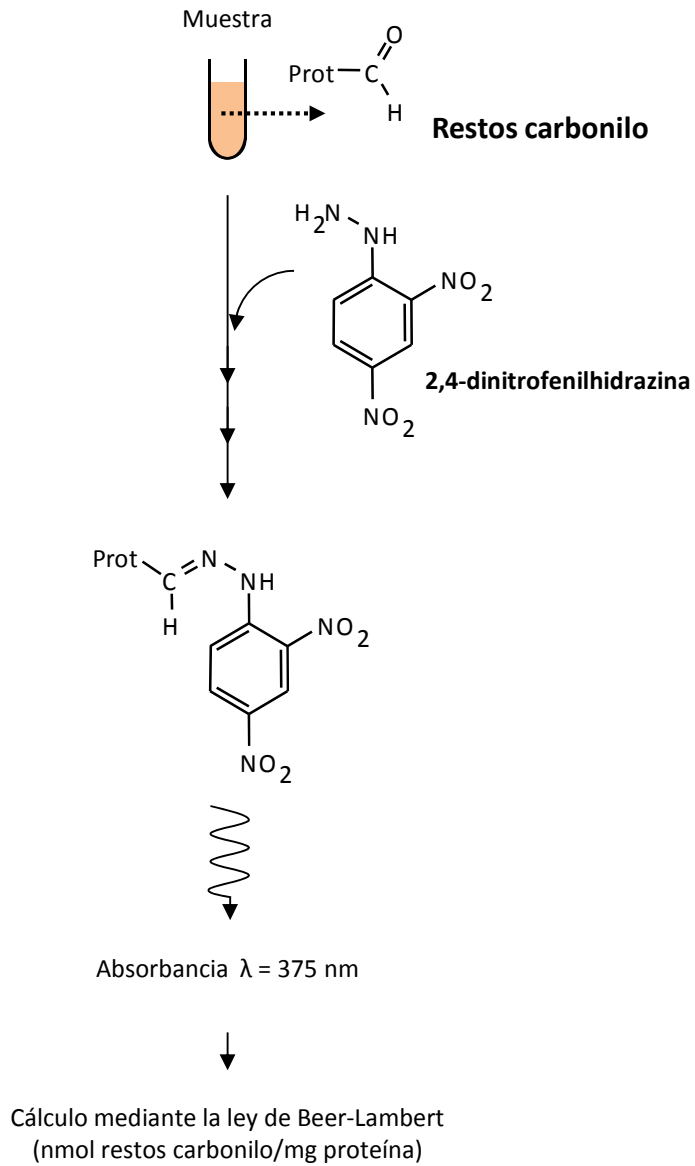


Fig. 22: Fundamento de la cuantificación de restos carbonilo en las proteínas.

#### 4.4.5. Determinación de la concentración de proteínas

Todos los resultados de los indicadores de daño oxidativo obtenidos en este trabajo (fluidez de las membranas, concentraciones de MDA + 4-HDA y presencia de restos carbonilo) están referidos a la concentración de proteínas de las muestras analizadas, para posibilitar su comparación.

Para calcularla se utilizó el método de Bradford (1976), basado en la reacción entre el azul de Coomassie y los aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina. Esta reacción produce cambios de absorbancia a 595 nm que son directamente proporcionales a la concentración total de proteínas (Fig. 24).

En este método, la cantidad de proteínas totales de la muestra problema se obtuvo interpolando su valor de absorbancia en la curva patrón de albúmina. Los valores de concentración de proteínas se expresaron en mg/mL. El programa utilizado fue Assay 4.0 (Biosoft®).

##### Protocolo:

- ✓ Dispensar 2 alícuotas de 1 µL del homogeneizado para la determinación de MDA + 4-HDA, carbonilación proteica o del purificado de membranas y mitocondrias.
- ✓ Añadir TRIS 0,02 M hasta completar 800 µL.
- ✓ Dispensar 200 µL de reactivo de Bradford de Bio-Rad® (Azul brillante de Coomassie G-250 al 0,01%, etanol al 4,7%, ácido ortofosfórico al 8,5% diluido en agua destilada).
- ✓ Agitar e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Leer la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.



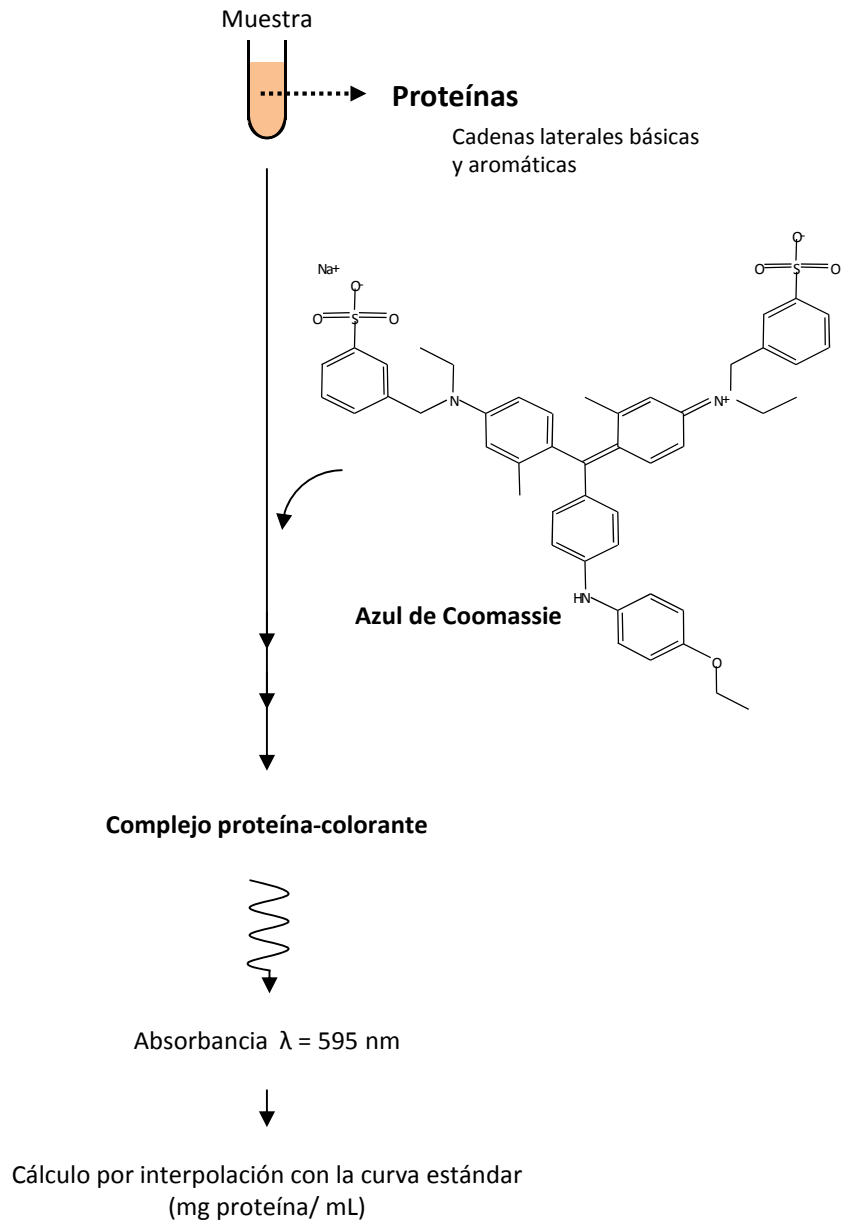


Fig. 23: Protocolo de cuantificación de proteínas.

## 4.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados ergométricos y analíticos obtenidos fueron tratados estadísticamente con el programa informático StatView 5.0.1.

Se realizaron dos estudios estadísticos, el primero consistió en la descripción de cada variable 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 se expresaron como media aritmética  $\pm$  error estándar; posteriormente, se realizó un estudio inferencial para comprobar si las diferencias entre las medias aritméticas de las variables eran o no estadísticamente significativas, lo que se logró aplicando el test de la *t* de Student para datos no pareados. El nivel de significación aceptado fue  $p \leq 0,05$ .

El programa informático utilizado para representar gráficamente los resultados fue GraphPad Prism versión 5.00.





## 5. RESULTADOS



## 5.1. ESTUDIOS ERGOMÉTRICOS

### 5.1.1. Pruebas de esfuerzo máximo

Salvo el grupo control, los cuatro restantes, grupos 2-5, realizaron una ergometría aguda hasta la extenuación. En la Tabla III y la Fig. 24 aparece la velocidad final de la prueba aguda alcanzada por cada rata, junto al cálculo de la velocidad media de cada grupo. Hubo un aumento significativo del rendimiento en el grupo 5 entre la primera ergometría (A) y la que se realizó a mitad del periodo de entrenamiento (B), causado por la adaptación al ejercicio.

*Tabla III: Velocidad final alcanzada por cada rata en la prueba ergométrica máxima, y media calculada en cada grupo de ejercicio. En el grupo 5 se calculó al inicio (A) y a las 6 semanas de entrenamiento (B).*

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. 5A.

GRUPOS	2	3	4	5	
				A	B
Velocidad final (m/s) n=10/grupo	0,24	0,30	0,27	0,27	0,24
	0,24	0,33	0,27	0,30	0,33
	0,30	0,33	0,30	0,30	0,36
	0,33	0,36	0,30	0,30	0,39
	0,33	0,36	0,30	0,30	0,42
	0,33	0,36	0,30	0,30	0,45
	0,33	0,39	0,33	0,33	0,45
	0,33	0,39	0,36	0,33	0,45
	0,33	0,39	0,39	0,33	0,48
	0,39	0,42	0,45	0,39	0,66
Media $\pm$ ES (m/s)	0,32 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>

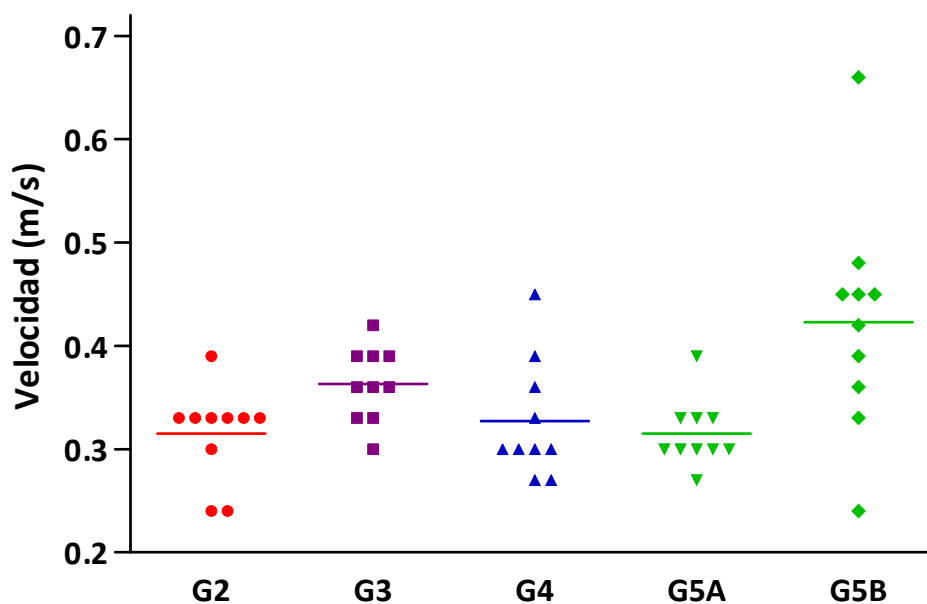


Fig. 24: Velocidades finales individuales en cada grupo. En el grupo 5, A hace referencia a la primera ergometría y B a la segunda. La línea horizontal coloreada indica la media aritmética correspondiente a cada grupo.

### 5.1.2. Programa de entrenamiento

Las cargas de trabajo de los grupos de entrenamiento se determinaron en función de las velocidades finales alcanzadas en la prueba ergométrica máxima. Teniendo en cuenta el número de calles del tapiz de entrenamiento (cinco), se conformaron dos subgrupos/grupo: ratas lentas y rápidas. Se utilizó la mediana de las velocidades finales de cada subgrupo como referencia para determinar las cargas de entrenamiento (35 y 80% de la máxima) (Tabla IV y Fig. 25).

Tabla IV: Carga de trabajo de los subgrupos de entrenamiento. En el grupo de 12 semanas, G5, se calculó al inicio (A) y a mitad del entrenamiento (B). En color azul se indican los porcentajes (35% y 80%) de las cargas de entrenamiento, expresadas en m/s.

GRUPOS ENTRENAMIENTO		3		4		5			
						A		B	
Subgrupos		Lentas	Rápidas	Lentas	Rápidas	Lentas	Rápidas	Lentas	Rápidas
$v_F$ ergometría (m/s)		0,30	0,36	0,27	0,30	0,27	0,30	0,24	0,45
		0,33	0,39	0,27	0,33	0,30	0,33	0,33	0,45
		0,33	0,39	0,30	0,36	0,30	0,33	0,36	0,45
		0,36	0,39	0,30	0,39	0,30	0,33	0,39	0,48
		0,36	0,42	0,30	0,45	0,30	0,39	0,42	0,66
Mediana $v_F$ (m/s)		0,33	0,39	0,30	0,36	0,30	0,33	0,36	0,45
Cargas entrenamiento (m/s)	35%	0,12	0,14	0,11	0,13	0,11	0,12	0,13	0,16
	80%	0,26	0,31	0,24	0,29	0,24	0,26	0,29	0,36

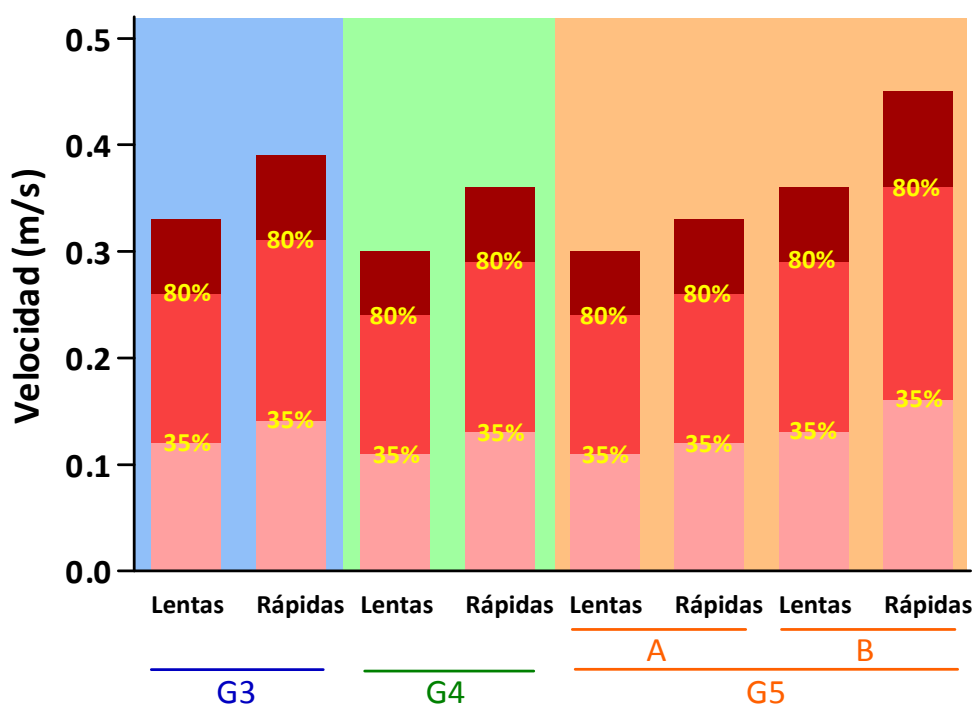


Fig. 25: Cargas de trabajo (35% y 80%) de cada subgrupo de entrenamiento. En el grupo 5, A hace referencia a la primera ergometría y B a la segunda.



## 5.2. ESTUDIO DE LA FLUIDEZ Y LOS INDICADORES DE LESIÓN OXIDATIVA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

### 5.2.1. Fluidez en la membrana celular

Los efectos del ejercicio sobre la fluidez de la membrana celular del músculo esquelético en ratas se ilustran en la Fig. 26. Existe un claro descenso de la fluidez de la membrana en todos los grupos de ejercicio, en comparación con el control ( $3,30 \pm 0,02$ ), siendo significativas ( $p \leq 0,05$ ) todas las comparaciones, excepto con el grupo de entrenamiento de 1 semana ( $3,24 \pm 0,03$ ). Tanto el ejercicio intenso hasta la extenuación ( $3,18 \pm 0,02$ ) como el entrenamiento de 4 y 12 semanas de duración ( $3,18 \pm 0,04$  y  $3,18 \pm 0,05$ , respectivamente) provocaron los mayores índices de rigidez.

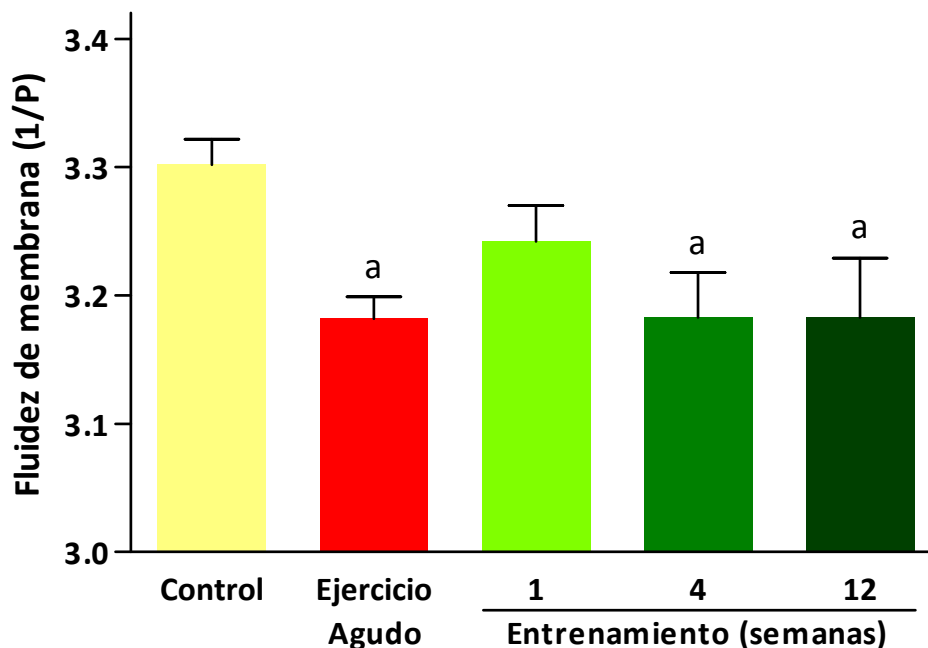


Fig. 26: Fluidez de membrana en el músculo esquelético de 50 ratas macho distribuidas en cinco grupos ( $n = 10/\text{grupo}$ ), en función del protocolo de ejercicio: sedentarias (control), prueba de esfuerzo progresiva hasta la extenuación, y periodos de entrenamiento (1, 4 y 12 semanas). Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados como el inverso de la polarización (1/P).

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control.

## 5.2.2. Fluidez en la mitocondria

La Fig. 27 representa la medición de la fluidez en mitocondrias aisladas de músculo esquelético. En este caso, hay un descenso drástico de los niveles de fluidez en los cuatro grupos de ejercicio en comparación con las ratas controles ( $3,28 \pm 0,03$ ). De hecho, los niveles de fluidez del grupo agudo ( $3,12 \pm 0,04$ ) son significativamente más bajos que los del control, e incluso esta disminución es más pronunciada en los tres grupos de entrenamiento: 1 semana ( $3,08 \pm 0,03$ ), 4 semanas ( $3,03 \pm 0,02$ ) y 12 semanas ( $3,06 \pm 0,04$ ).

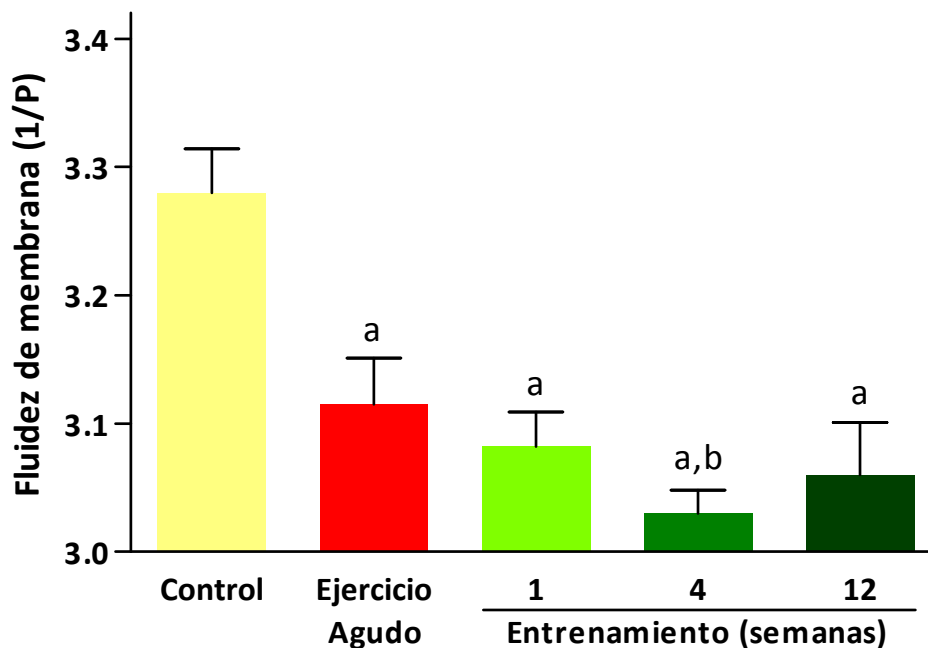


Fig. 27: Fluidez de membrana en mitocondrias aisladas de músculo esquelético, según el protocolo de ejercicio: sedentarias (control), ejercicio agudo, y entrenamiento de varios periodos (1, 4 y 12 semanas).

Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados como el inverso de la polarización (1/P).

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control, <sup>b</sup> vs. agudo.

### 5.2.3. Peroxidación lipídica

Los resultados del análisis estadístico de las concentraciones de MDA + 4-HDA en los homogeneizados de músculo esquelético se ilustran en la Fig. 28. Puede observarse un incremento del daño oxidativo lipídico en los cuatro grupos de ejercicio en comparación con el grupo control ( $0,16 \pm 0,02$  nmol/mg prot.). Las mayores peroxidaciones lipídicas fueron en el grupo en el que el ejercicio se realizó hasta la extenuación ( $0,30 \pm 0,03$  nmol/mg prot.), así como en el grupo de entrenamiento de 1 semana ( $0,25 \pm 0,03$  nmol/mg prot.). En el entrenamiento prolongado (4 y 12 semanas) existe aumento de MDA + 4-HDA, en comparación con el reposo, pero no de forma significativa ( $0,23 \pm 0,03$  y  $0,24 \pm 0,06$  nmol/mg prot., respectivamente).

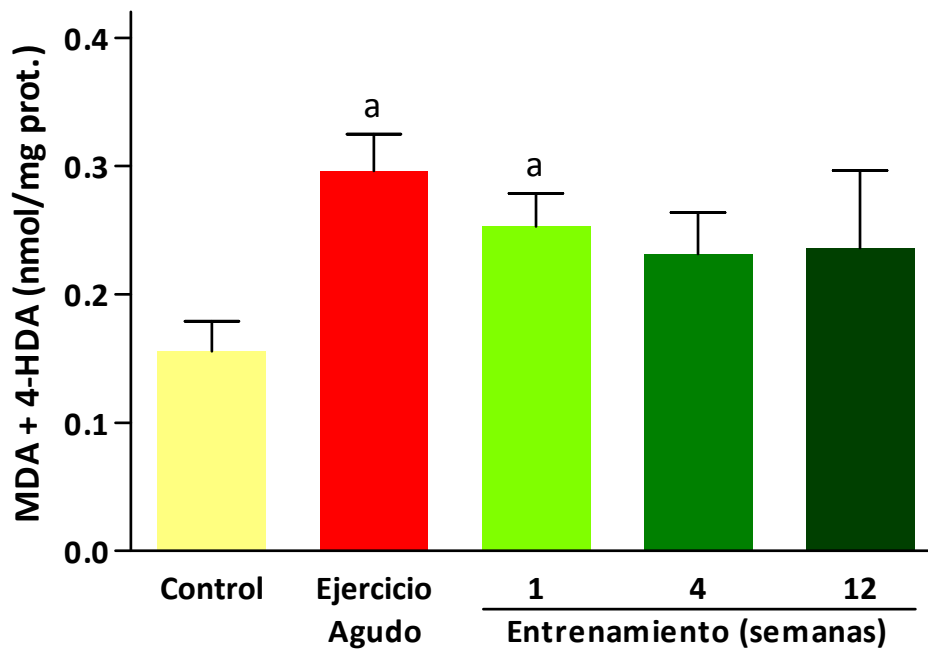


Fig. 28: Concentraciones de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetaldehído (4-HDA) en homogeneizados de músculo esquelético, según el protocolo de ejercicio: control, test agudo hasta la extenuación, y entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas. Los datos (media  $\pm$  ES) se expresan en nmol/mg prot.

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control.

## 5.2.4. Carbonilación proteica

Con respecto a las concentraciones de carbonilos proteicos en los homogeneizados de músculo esquelético, en la Fig. 29 se observa un incremento significativo en el grupo de ejercicio agudo ( $4,61 \pm 0,62$  nmol/mg prot.) y en el grupo de entrenamiento de 1 semana ( $4,00 \pm 0,29$  nmol/mg prot.) en comparación con el control ( $2,88 \pm 0,40$  nmol/mg prot.), siendo el ejercicio agudo en el que más daño se produce, así como ocurre con la determinación de la LPO. Por otra parte, en los grupos de entrenamiento prolongado, 4 y 12 semanas, el contenido de carbonilos proteicos es sólo ligeramente mayor en comparación con el control ( $2,95 \pm 0,25$  y  $3,04 \pm 0,20$  nmol/mg prot., respectivamente). Sin embargo, en estos dos grupos de entrenamiento sí que se apreciaron descensos significativos con respecto a los grupos de ejercicio agudo y de entrenamiento de 1 semana.

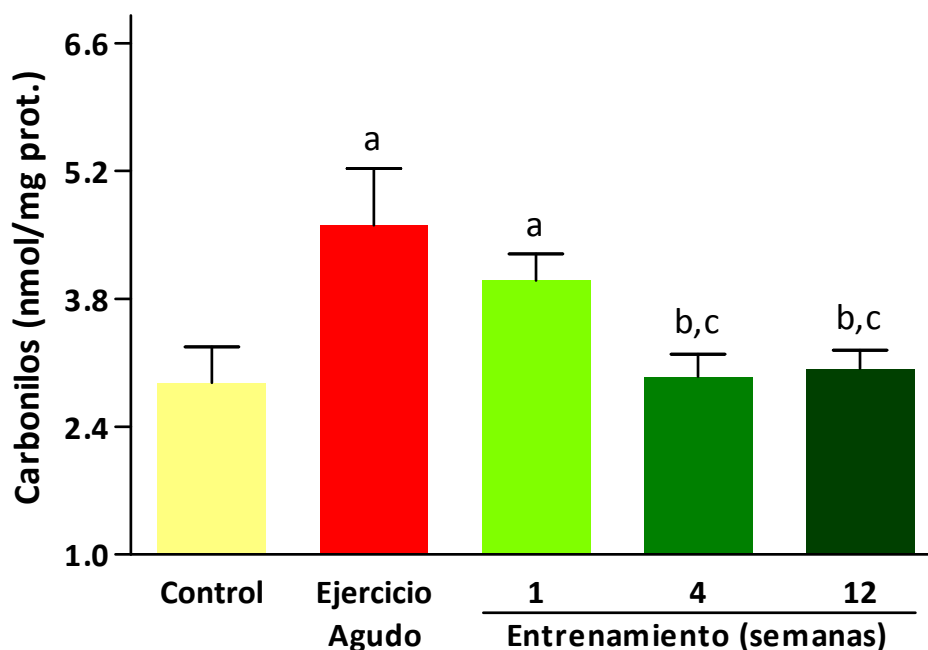


Fig. 29: Efectos del ejercicio en las concentraciones de carbonilos proteicos en homogeneizados de músculo esquelético de ratas: sedentarias (control), test progresivo continuo hasta la extenuación (ejercicio agudo), y varios periodos de entrenamiento (1, 4 y 12 semanas). Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados en nmol/mg prot. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control, <sup>b</sup> vs. agudo, <sup>c</sup> vs. 1 semana.

## 5.3. FLUIDEZ, PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y CARBONILACIÓN PROTEICA EN MÚSCULO CARDIACO

### 5.3.1. Fluidez en la membrana celular

La Fig. 30 ilustra los niveles de fluidez de la membrana celular en el músculo cardiaco. En ella, se puede observar rigidez en la membrana de todos los grupos que realizaron ejercicio en comparación con el grupo control ( $3,05 \pm 0,03$ ), siendo la disminución significativa tanto en las ratas que realizaron una única prueba de ejercicio ( $2,94 \pm 0,02$ ) como en las que llevaron a cabo un entrenamiento de 1 ( $2,97 \pm 0,02$ ), 4 ( $2,91 \pm 0,02$ ) y 12 semanas ( $2,91 \pm 0,02$ ). Además, en el grupo de 4 semanas de entrenamiento las diferencias estadísticas también fueron significativas con respecto al grupo de tan sólo 1 semana de entrenamiento.

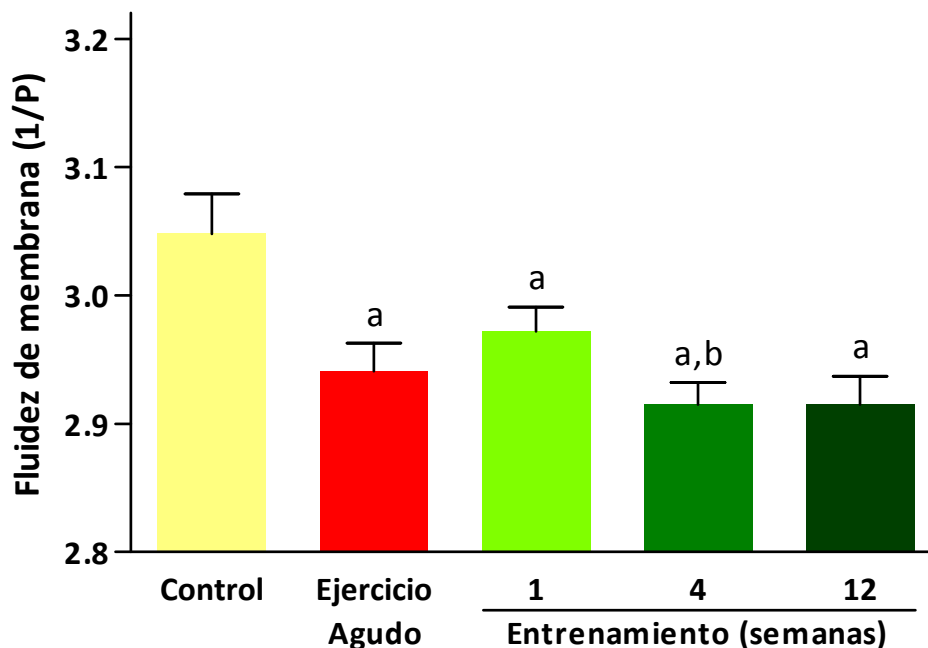


Fig. 30: Fluidez de membrana en miocardiocitos de 50 ratas macho, en función del protocolo de ejercicio: sedentarias, test de ejercicio agudo, y entrenamientos de 1, 4 y 12 semanas. Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados como el inverso de la polarización (1/P).

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control, <sup>b</sup> vs. 1 semana de entrenamiento.

### 5.3.2. Fluidez en la mitocondria

De forma similar a lo que ocurrió en las membranas celulares, al valorar los niveles de fluidez en la mitocondria, hubo rigidez en todos los grupos de ejercicio con respecto al grupo sedentario ( $3,07 \pm 0,03$ ) (Fig. 31). Los niveles de fluidez descendieron significativamente en los grupos agudo ( $2,97 \pm 0,04$ ), entrenamiento de 1 semana ( $2,99 \pm 0,03$ ) y 4 semanas ( $2,96 \pm 0,02$ ), siendo la caída más acentuada en el grupo de 12 semanas de entrenamiento ( $2,91 \pm 0,02$ ), un cambio suficiente para justificar que hubiera diferencias significativas con el grupo de 1 semana de entrenamiento.

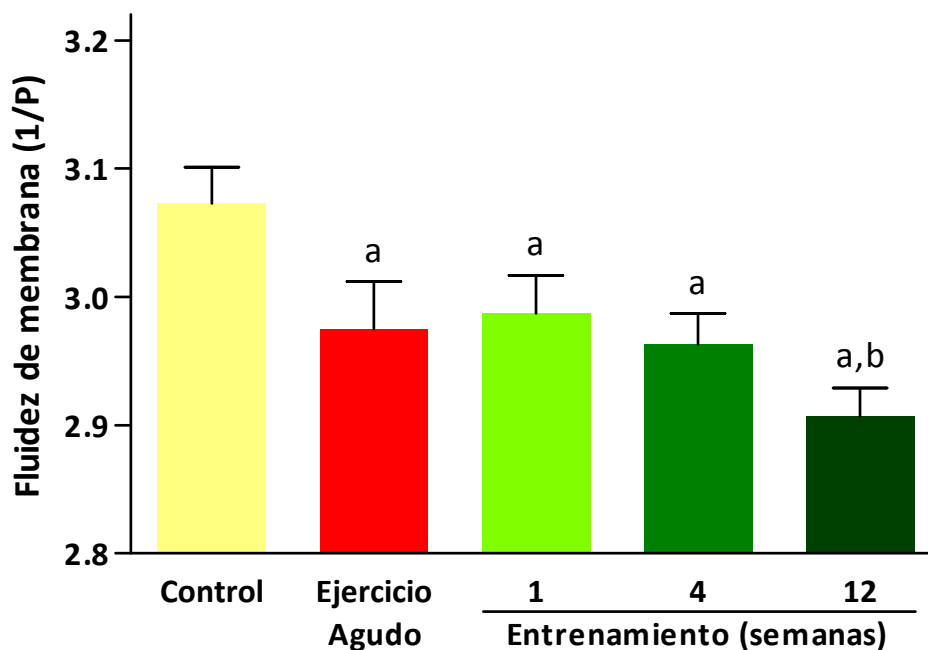


Fig. 31: Fluidez de membrana en mitocondrias cardiacas. Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados como el inverso de la polarización (1/P). <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control, <sup>b</sup> vs. 1 semana.

### 5.3.3. Peroxidación lipídica

El análisis de la concentración de los marcadores de la LPO (MDA + 4-HDA) en el músculo cardíaco se ilustra en la Fig. 32. En ésta no se observan cambios significativos en ninguno de los grupos de estudio. Tanto el grupo de ejercicio agudo ( $0,40 \pm 0,02$  nmol/mg prot.) como los de entrenamiento de 1 ( $0,37 \pm 0,01$  nmol/mg prot.), 4 ( $0,39 \pm 0,01$  nmol/mg prot.) y 12 semanas ( $0,38 \pm 0,02$  nmol/mg prot.) presentaron valores similares con respecto al control ( $0,39 \pm 0,02$  nmol/mg prot.).

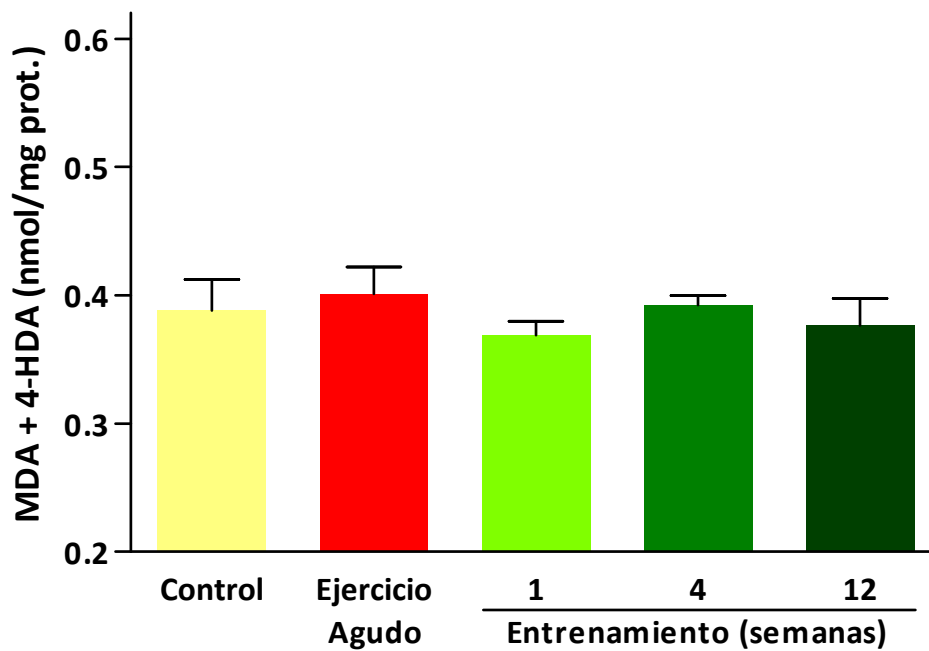


Fig. 32: Concentraciones de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiálquenos (4-HDA) en homogeneizados cardíacos de 50 ratas distribuidas en cinco grupos: sedentarias, test progresivo agudo, y entrenamiento (1, 4 y 12 semanas). Los datos (media  $\pm$  ES) se expresan en nmol/mg prot.

### 5.3.4. Carbonilación proteica

Atendiendo a la concentración de los restos carbonilo proteicos como índice de oxidación proteica en homogeneizados cardiacos, se aprecia una elevación del daño oxidativo proteico en el grupo de esfuerzo agudo ( $8,65 \pm 0,38$  nmol/mg prot.) respecto a los controles ( $5,77 \pm 1,17$  nmol/mg prot.). En el entrenamiento de 1 semana ( $8,02 \pm 0,56$  nmol/mg prot.), 4 semanas ( $7,82 \pm 0,69$  nmol/mg prot.) y 12 semanas ( $7,88 \pm 1,11$  nmol/mg prot.), comparando las concentraciones de carbonilos con las del grupo control, los aumentos no fueron significativos (Fig. 33).

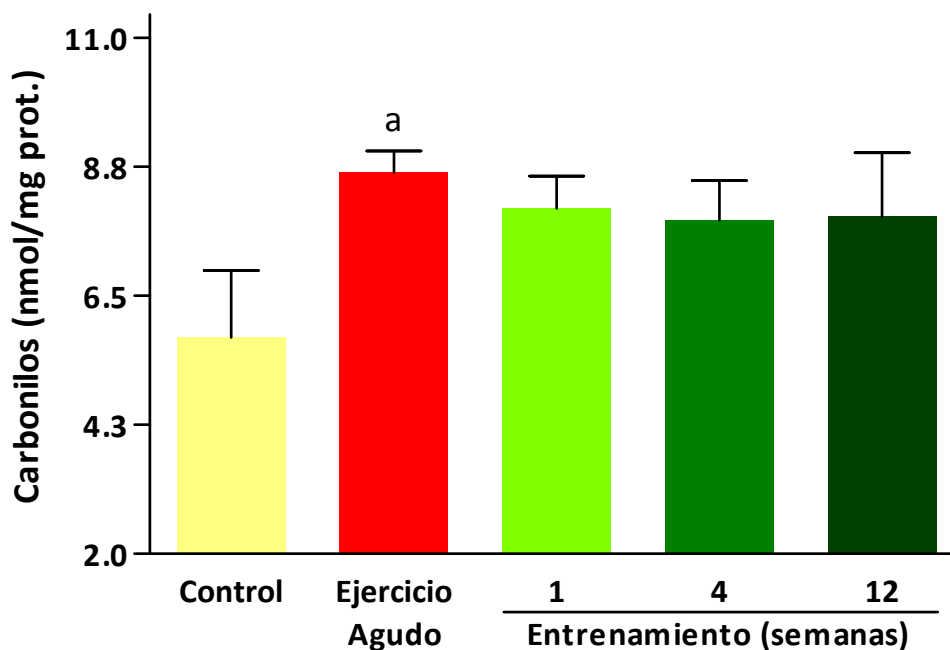


Fig. 33: Carbonilación proteica en homogeneizados de corazón en ratas sedentarias, que realizaron ejercicio agudo, y varios periodos de entrenamiento (1, 4 y 12 semanas). Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados en nmol/mg prot. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control.



## 5.4. NIVELES DE FLUIDEZ DE MEMBRANA E INDICADORES DE LESIÓN OXIDATIVA HEPÁTICOS

### 5.4.1. Fluidez en la membrana celular

En la fluidez de la membrana celular de los hepatocitos (Fig. 34), se puede observar que apenas se produjeron cambios en los niveles de fluidez en ninguno de los grupos de ejercicio con respecto al grupo control ( $3,20 \pm 0,02$ ). Tanto tras un ejercicio agudo ( $3,21 \pm 0,03$ ) como después de realizar un entrenamiento de 1 semana ( $3,18 \pm 0,02$ ), 4 semanas ( $3,18 \pm 0,02$ ) y 12 semanas ( $3,18 \pm 0,02$ ), estos niveles se mantuvieron próximos a los controles.

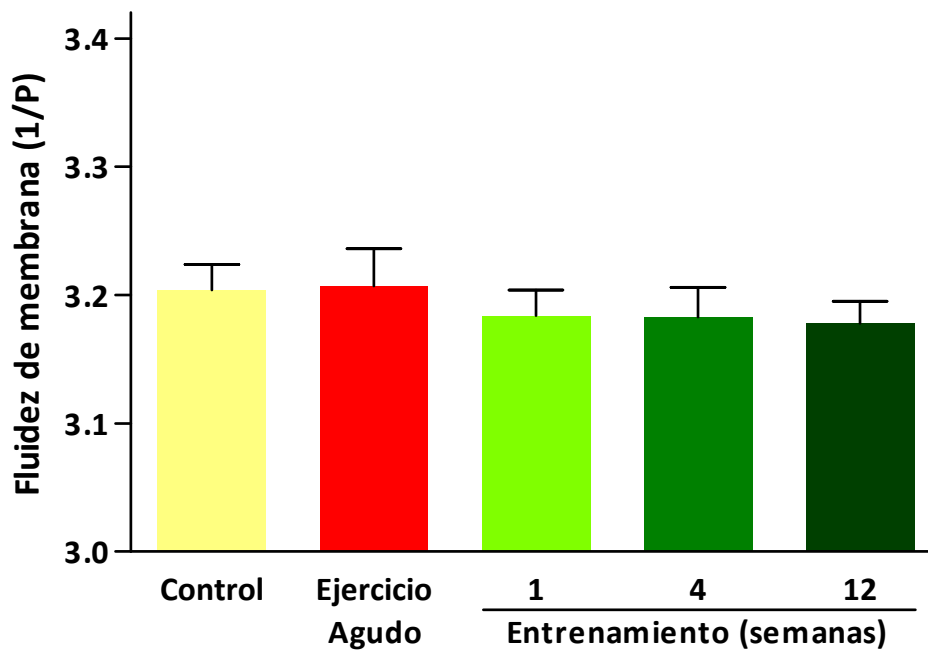


Fig. 34: Fluidez de membrana en hepatocitos de 50 ratas distribuidas en cinco grupos: sedentarias (control), ejercicio agudo, y varios periodos de entrenamiento (1, 4 y 12 semanas). Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados como el inverso de la polarización (1/P).

## 5.4.2. Fluidez en la mitocondria

Al contrario de lo ocurrido en la membrana de los hepatocitos, en las mitocondrias hepáticas se produce una disminución de la fluidez en los grupos de ejercicio respecto al reposo ( $3,14 \pm 0,03$ ). La Fig. 35 ilustra estos resultados. De esta forma, se produjo rigidez después de realizar una prueba aguda ( $3,06 \pm 0,02$ ), así como en el entrenamiento de 4 semanas ( $3,04 \pm 0,03$ ). También se apreció una disminución de la fluidez, aunque sin significación estadística, en los entrenamientos de 1 semana ( $3,08 \pm 0,04$ ) y más aún de 12 semanas ( $3,06 \pm 0,04$ ).

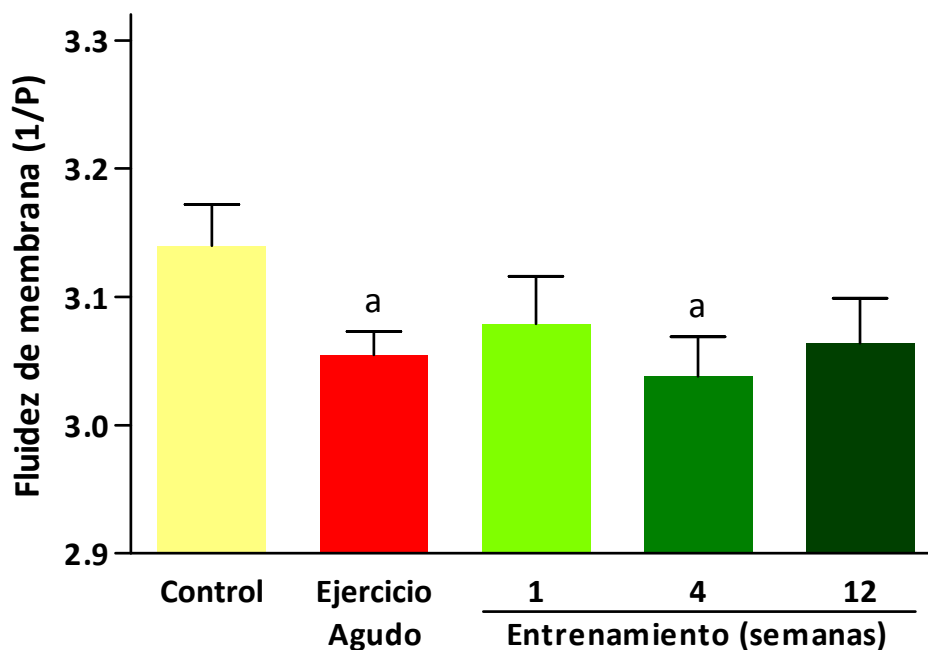


Fig. 35: Fluidez de membrana en mitocondrias hepáticas: sedentarias (control), tras realizar un test progresivo agudo, y varios periodos de entrenamiento (1, 4 y 12 semanas). Los datos (media  $\pm$  ES) se expresan como el inverso de la polarización (1/P). <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control.

### 5.4.3. Peroxidación lipídica

En lo concerniente a las concentraciones de MDA + 4-HDA en el tejido hepático (Fig. 36) hubo un aumento significativo en cada uno de los grupos de ejercicio con respecto al grupo control ( $0,20 \pm 0,01$  nmol/mg prot.). Se observa una clara relación entre la concentración de MDA + 4-HDA y la duración del entrenamiento, obteniéndose un aumento significativo en los grupos agudo ( $0,23 \pm 0,01$  nmol/mg prot.) y de 1 semana de entrenamiento ( $0,24 \pm 0,01$  nmol/mg prot.); siendo más pronunciado a las 4 semanas ( $0,28 \pm 0,01$  nmol/mg prot.) y todavía más en el de 12 ( $0,29 \pm 0,01$  nmol/mg prot.), con una significación estadística en relación al grupo control, agudo y entrenamiento de 1 semana.

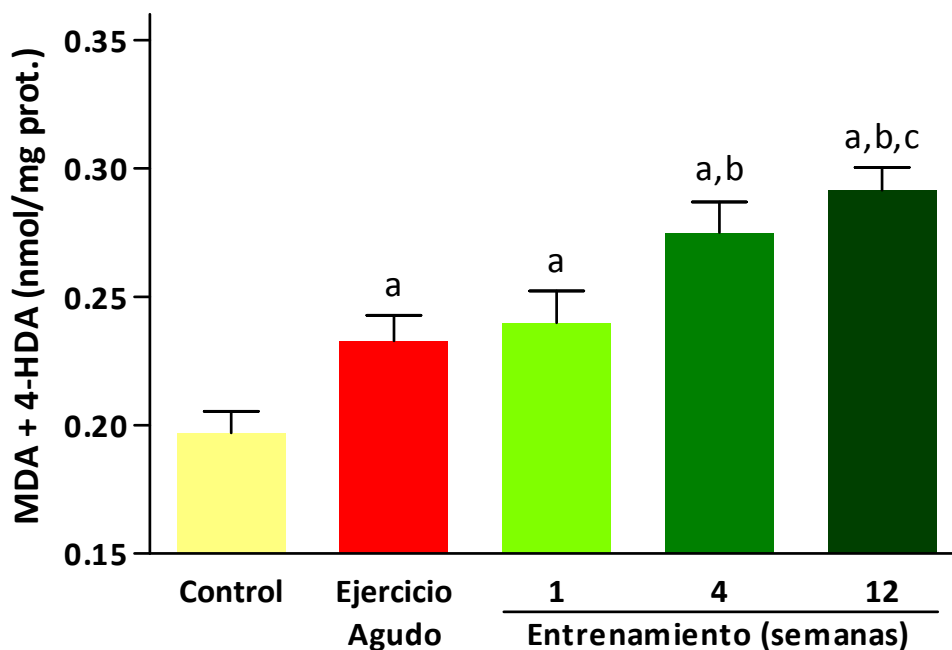


Fig. 36: El ejercicio agudo y el entrenamiento indujeron peroxidación lipídica en homogeneizados de hígado. Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados en nmol/mg prot.

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control, <sup>b</sup> vs. agudo, <sup>c</sup> vs. 1 semana.

### 5.4.4. Carbonilación proteica

Con respecto al marcador de oxidación proteica, la presencia de restos carbonilo, también se apreció una fuerte elevación en su concentración en todos los grupos de ejercicio, ya sea agudo o entrenamiento, en comparación con el grupo control ( $5,49 \pm 0,52$  nmol/mg prot.) (Fig. 37). La mayor concentración del contenido en restos carbonilos proteicos en los homogeneizados hepáticos se alcanzó en el grupo de esfuerzo físico agudo ( $8,96 \pm 0,52$  nmol/mg prot.), con valores similares en los grupos de entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas ( $8,73 \pm 0,68$ ;  $8,39 \pm 0,76$ ; y  $8,19 \pm 0,77$  nmol/mg prot., respectivamente).

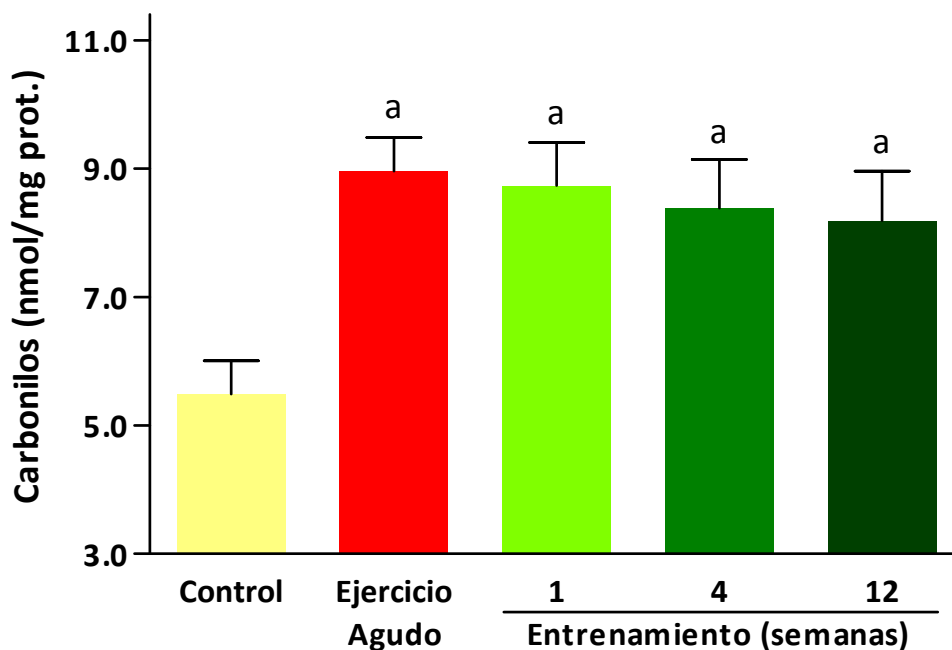


Fig. 37: Concentraciones de restos carbonilos en homogeneizados de hígado de 50 ratas macho distribuidas en cinco grupos, en función del protocolo de ejercicio: sedentarias, test de ejercicio agudo, y varios periodos de entrenamiento (1, 4 y 12 semanas). Los datos (media  $\pm$  ES) se expresan en nmol/mg prot. <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control.

## 5.5. EFECTOS DEL EJERCICIO EN LA FLUIDEZ Y OXIDACIÓN EN EL TEJIDO NERVIOSO CENTRAL

### 5.5.1. Fluidez en los sinaptosomas

La Fig. 38 ilustra los efectos del ejercicio sobre la fluidez de los sinaptosomas. Independientemente de la modalidad del ejercicio, en todos los grupos se produjo una marcada rigidez en la membrana en comparación con el grupo control ( $2,84 \pm 0,02$ ), siendo significativa tanto en el ejercicio agudo ( $2,76 \pm 0,01$ ) como en los entrenamientos de 1, 4 y 12 semanas ( $2,77 \pm 0,02$ ;  $2,76 \pm 0,02$ ; y  $2,73 \pm 0,01$ , respectivamente). Los niveles más bajos de fluidez se alcanzaron en el grupo de entrenamiento de mayor duración.

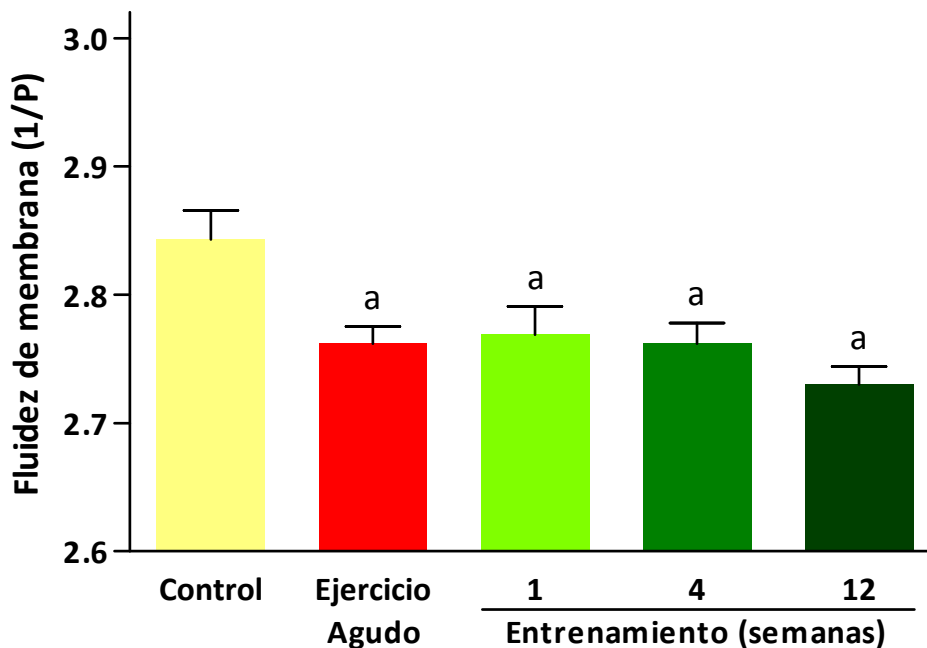


Fig. 38: El ejercicio indujo rigidez en los sinaptosomas de 50 ratas distribuidas, en función del ejercicio que realizaron: controles, ejercicio agudo, y entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas. Los datos (media  $\pm$  ES) están expresados como el inverso de la polarización (1/P). <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control.

## 5.5.2. Fluidez en la membrana mitocondrial

En las mitocondrias aisladas del tejido nervioso no se observaron cambios, tal y como se demuestra en la Fig. 39. Tomando como referencia el grupo control ( $3,39 \pm 0,06$ ), hay mínimos cambios en la fluidez mitocondrial en el ejercicio agudo ( $3,43 \pm 0,06$ ), en el entrenamiento de 1 semana ( $3,47 \pm 0,03$ ) y en el entrenamiento de 4 semanas ( $3,41 \pm 0,04$ ), y una disminución muy leve en el entrenamiento de 12 semanas ( $3,37 \pm 0,06$ ). En ninguna de estas comparaciones se observan diferencias significativas con el control.

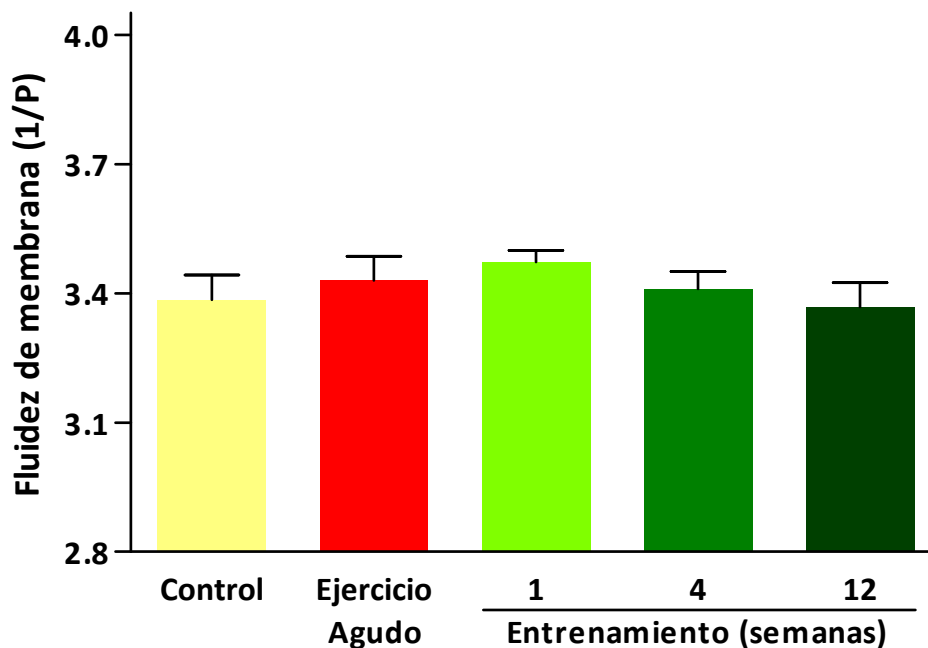


Fig. 39: Fluidez de membranas mitocondriales aisladas a partir del cerebro de ratas sedentarias, que realizaron ejercicio agudo, y tras varios periodos de entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas. Los datos (media  $\pm$  ES) se expresan como el inverso de la polarización (1/P).

### 5.5.3. Peroxidación lipídica

Se observó (Fig. 40) un incremento significativo en la concentración de MDA + 4-HDA en los homogeneizados de cerebro del grupo de ejercicio agudo ( $0,59 \pm 0,06$  nmol/mg prot.) en comparación con los del grupo control ( $0,44 \pm 0,02$  nmol/mg prot.). Por otra parte, en los grupos de entrenamiento, los niveles de malonildialdehído sufrieron una pequeña disminución, aunque no significativa, respecto al control ( $0,38 \pm 0,03$ ;  $0,42 \pm 0,03$ ;  $0,38 \pm 0,02$  nmol/mg prot.; correspondientes a 1, 4 y 12 semanas, respectivamente); en cambio, sí hubo diferencias al comparar éstos con el grupo de ejercicio agudo.

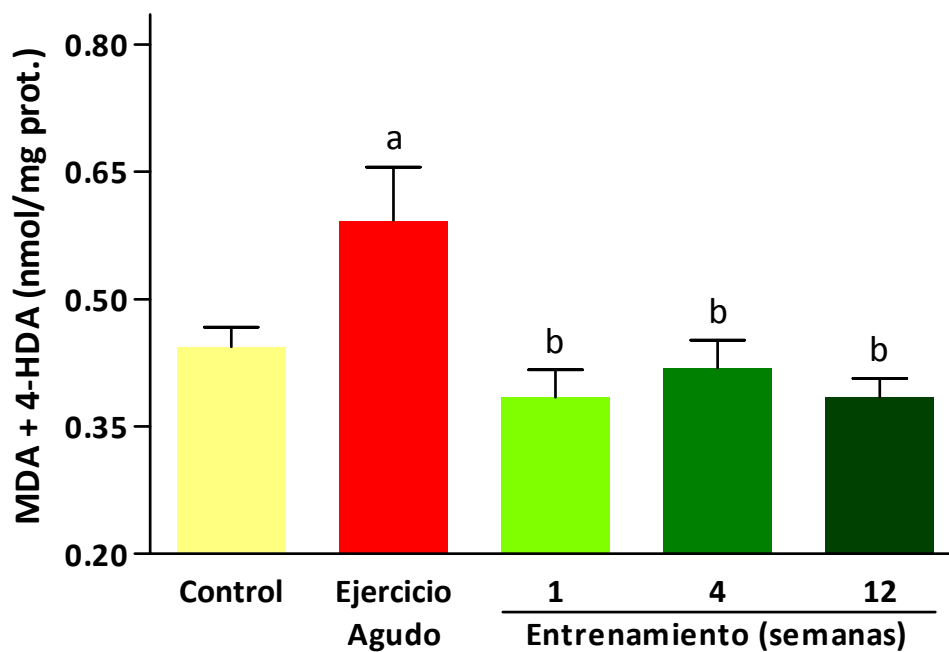


Fig. 40: Peroxidación lipídica en homogeneizados de cerebro de 50 ratas macho distribuidas en cinco grupos ( $n = 10/\text{grupo}$ ), según el protocolo de ejercicio: control, test progresivo agudo, y entrenamientos de 1, 4 y 12 semanas. Los datos (media  $\pm$  ES) se expresan en nmol/mg prot.

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  vs. control, <sup>b</sup> vs. agudo.

### 5.5.4. Carbonilación proteica

Los efectos del ejercicio sobre el contenido de carbonilos proteicos en los homogeneizados de cerebro se recogen en la Fig. 41. Aunque se observan pequeños incrementos en su concentración en los cuatro grupos de ejercicio en comparación con el grupo control ( $10,14 \pm 1,01$  nmol/mg prot.), los resultados son parecidos en todos los grupos, siendo más similares en el ejercicio agudo ( $11,44 \pm 1,81$  nmol/mg prot.) y el entrenamiento de 4 semanas ( $10,36 \pm 1,64$  nmol/mg prot.), y un poco más elevados en el caso de los grupos de entrenamiento de 1 semana ( $12,72 \pm 1,96$  nmol/mg prot.), así como el de 12 semanas ( $12,57 \pm 1,82$  nmol/mg prot.).

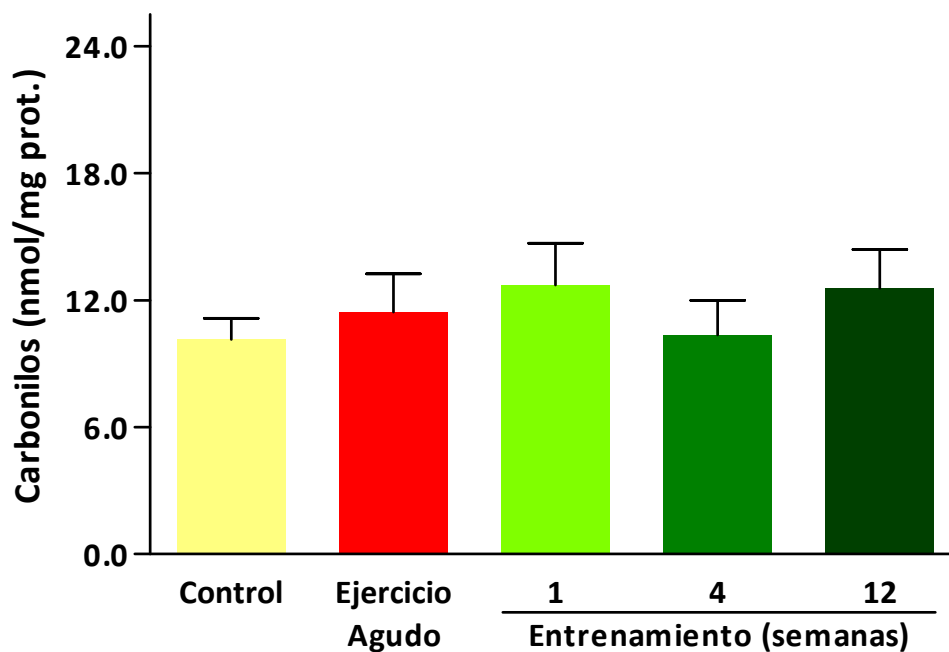


Fig. 41: Concentraciones de carbonilos en homogeneizados de tejido nervioso de 50 ratas macho distribuidas en cinco grupos ( $n = 10/\text{grupo}$ ), en función del tipo de ejercicio: sedentarias, ejercicio agudo, y entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas. Los datos (media  $\pm$  ES) se expresan en nmol/mg prot.







## 6. DISCUSIÓN



El objetivo fundamental de este trabajo científico ha sido analizar los efectos locales y sistémicos del ejercicio físico sobre la fluidez de las membranas biológicas, tanto celulares como mitocondriales, y relacionar sus cambios con dos indicadores de lesión oxidativa: uno a nivel de los lípidos, MDA + 4-HDA, y otro de las proteínas, carbonilación proteica. Una consideración importante que se planteó fue que en los estudios de fisiología aplicada al ejercicio físico hay multitud de posibilidades metodológicas, derivadas de las casi infinitas variantes de tipo, duración e intensidad del trabajo físico a realizar. Esta riqueza determina que en la literatura científica, frecuentemente, bajo el epígrafe común “efectos del ejercicio físico sobre...”, se describan resultados que conducen a interpretaciones dispares. Por ello, en este trabajo decidimos utilizar sólo métodos de ejercicio físico que fueran medibles y reproducibles, basados en criterios objetivos y que respondieran a dos supuestos experimentales diferentes: uno destinado a interpretar los cambios producidos por un ejercicio agudo de intensidad máxima, y otro en el que valoramos los efectos del ejercicio submáximo repetido a lo largo de un periodo de tiempo, como fue un entrenamiento de 1, 4 y 12 semanas de duración.

No cabe duda que estudiar los mecanismos adaptativos que la actividad física provoca en el tejido muscular tiene máximo interés, ya que la contracción muscular es el requisito esencial para que el ejercicio pueda realizarse. Atendiendo a la fluidez del sarcolema, el ejercicio físico agudo provocó una marcada rigidez. Estos resultados obtenidos en el músculo esquelético están en concordancia con los que nuestro grupo de investigación obtuvo en un estudio donde el ejercicio físico agudo máximo y submáximo, controlado mediante cicloergometría, disminuyó la fluidez en los eritrocitos de un grupo de 30 personas sanas jóvenes no entrenadas (Berzosa y cols., 2011a). Unos resultados que se obtuvieron mediante espectroscopía de fluorescencia, utilizando el TMA-DPH como marcador fluorescente, el mismo que hemos empleado en el estudio que presentamos en esta memoria de tesis doctoral. El TMA-DPH tiene ventajas importantes sobre otros marcadores fluorescentes de membrana, ya que incorpora un resto TMA que le confiere hidrosolubilidad a la molécula DPH, un compuesto exclusivamente hidrofóbico que, en ausencia del resto TMA, se concentra de forma anárquica en el *core* de la bicapa lipídica. Por el contrario, el comportamiento anfipático del TMA-DPH es responsable de que, al añadirlo a las membranas biológicas, éste se intercale de forma paralela al eje longitudinal de los fosfolípidos con su resto catiónico orientado hacia la superficie (Prendergast y cols., 1981), lo que sin duda permite reflejar mejor los movimientos de los fosfolípidos de la bicapa. Nuestros resultados son equiparables a los que se obtuvieron con el 5-doxyl-esteárico (5-DS), lo que sugiere que la rigidez causada por el

ejercicio agudo afecta principalmente a la parte más externa de la bicapa lipídica (Brzeczczynska y cols., 2008). Además de los eritrocitos humanos, se han obtenido resultados similares a los nuestros en membranas eritrocitarias de otras especies animales, como el caballo (De Moffarts y cols., 2007), el perro (Motta y cols., 2009) y la rata (Teleglów y cols., 2011).

Al igual que en la membrana celular, el ejercicio agudo máximo también redujo la fluidez en las mitocondrias aisladas del músculo esquelético. De forma paralela a nuestro estudio, Pérez y cols. (2003) midieron la fluidez mitocondrial en cuatro músculos: vasto externo, gastrocnemio, tibial y extensor largo de los dedos, en tres grupos de ratas que siguieron protocolos de ejercicios de tipo extenuante realizados en tapiz rodante. Si bien en los dos primeros obtuvieron una marcada rigidez en la membrana mitocondrial, en el tibial y el extensor largo de los dedos, los cambios no fueron significativos, por lo que concluyeron que las alteraciones en la fluidez mitocondrial causadas por el ejercicio agudo de gran intensidad se correlacionaron con el grado de actividad contráctil desarrollada por el grupo muscular que se analizó. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas tras un test de ejercicio agudo en membranas de retículo endoplásmico de músculo esquelético, utilizando la resonancia paramagnética del *spin* electrónico, si bien se utilizaron tejidos extraídos dos horas después de la conclusión del ejercicio, lo que dificulta poder valorar si la discrepancia era debida a la utilización de un método de determinación de fluidez en la membrana diferente al que nosotros utilizamos, o más bien se deba al tiempo que transcurrió entre la finalización del ejercicio y la medición, ya que durante esas dos horas pudieron restablecerse los niveles de fluidez del reposo, o, al menos, reducirse las diferencias originadas por el ejercicio agudo (Ferrington y cols., 1996).

Entre los posibles factores responsables de la rigidez de la bicapa lipídica en una membrana biológica durante el ejercicio físico destacan los cambios en la composición química de la membrana, especialmente una reducción en la relación de ácidos grasos poliinsaturados versus saturados, que son parte integrante de las colas de los fosfolípidos de la bicapa (Curtis y cols., 1984). También debe considerarse la formación de uniones cruzadas entre lípidos y entre éstos con las proteínas, lo que restringe el grado de movimiento (Chen y Yu, 1994), y, finalmente, la oxidación de las proteínas que, junto con los lípidos, conforman las membranas biológicas (Shinitzky, 1984).

Es bien aceptado que el ejercicio físico agudo aumenta la producción de radicales libres y otras especies reactivas dependientes del oxígeno en relación a los niveles basales del reposo (Bloomer y Fisher-Wellman, 2008; Powers y Jackson, 2008), y también que el estrés

oxidativo ocasionado pone en marcha la peroxidación lipídica en las membranas biológicas, una reacción caracterizada por ser un proceso degenerativo autooxidativo de reacción en cadena, cuyo principal sustrato son los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la bicapa (Gutteridge, 1995). Además, los grupos tioles de las proteínas que integran las membranas celulares se oxidan fácilmente por los radicales libres (Nakazawa y cols., 2006). Por las relaciones de estos tres hechos, decidimos cuantificar en nuestro estudio el MDA + 4-HDA y la carbonilación proteica en los homogeneizados tisulares, unos parámetros bioquímicos que se utilizan frecuentemente para la valoración de la oxidación lipídica y proteica de las muestras tisulares.

Tras el esfuerzo físico agudo, tanto las concentraciones de MDA + 4-HDA como los niveles de carbonilación proteica fueron significativamente mayores respecto al grupo de ratas sedentarias, resultados que reflejan un marcado incremento de la oxidación mediada por radicales libres y causada por el ejercicio agudo. En este mismo sentido, se han descrito aumentos de las concentraciones de MDA, tras un protocolo de ejercicio agudo en el músculo esquelético de la rata (Huang y cols., 2008; Koçtürk y cols., 2008), así como de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Li y cols., 1999). Otros autores, utilizando diversos protocolos de ejercicio físico agudo, también han observado aumentos, incluso llegando a alcanzar el 30%, en algunos músculos con respecto al reposo, aunque sin significación estadística (Judge y cols., 2005; You y cols., 2005), aunque en otros estudios no se han apreciado cambios (Molnar y cols., 2006; Kon y cols., 2007). Asimismo, observamos carbonilación de los aminoácidos de las proteínas musculares esqueléticas tras el esfuerzo agudo máximo, lo que puede causar daños estructurales irreversibles y, en consecuencia, pérdida de su función (Oliver, 1987; Levine y Stadtman, 2001). Unos resultados que están en la misma línea que los obtenidos en rata, tras una carrera en tapiz rodante declinado durante 90 minutos a nivel del vasto intermedio y el sóleo (You y cols., 2005), y tras un test de esfuerzo aeróbico al 80% del  $VO_2$ max (Lamprecht y cols., 2008); si bien los cambios no fueron significativos con ejercicios agudos de menor intensidad, al 70% del  $VO_2$ max (Lamprecht y cols., 2008), lo que sugiere una relación entre la lesión oxidativa de las proteínas y la intensidad del ejercicio realizado. Haciendo una analogía con nuestro estudio previo sobre la carbonilación proteica plasmática en humanos, también observamos incrementos significativos cuando las pruebas cicloergométricas fueron de tipo exhaustivo, y en cambio no fueron en ejercicios agudos submáximos (Berzosa y cols., 2011a).

Con respecto a las mediciones realizadas en los animales en reposo, el entrenamiento produjo rigidez en el sarcolema y especialmente en las mitocondrias aisladas del músculo

esquelético, ya que en la membrana los cambios fueron significativos a partir de la cuarta semana de entrenamiento y en la mitocondria se evidenciaron desde la primera semana. Por otra parte, la caída en la fluidez fue más marcada en los entrenamientos de mayor duración. A este respecto, en la literatura científica tan sólo unos pocos estudios describen cambios en la respuesta al ejercicio agudo, refiriéndose a descensos de los niveles de fluidez tras un período de ocho semanas de entrenamiento (Pérez y cols., 2003), así como rigidez de la membrana eritrocitaria en caballos entrenados mediante carrera durante seis semanas (De Moffarts y cols., 2007).

A diferencia de lo que sucedió en la valoración de la fluidez de la membrana, los indicadores de lesión oxidativa de lípidos y proteínas, que tras la primera semana de entrenamiento fueron más elevados que los controles no entrenados, se fueron reduciendo a lo largo del entrenamiento, especialmente en la mitocondria del músculo esquelético, el lugar donde más marcada había sido la rigidez de la membrana causada por ejercicio físico. Los niveles de carbonilación proteica, obtenidos tras cuatro y doce semanas de entrenamiento en los homogeneizados musculares, fueron prácticamente indistinguibles de los controles no entrenados, y significativamente menores que los obtenidos inmediatamente tras finalizar el ejercicio agudo o en reposo tras una semana de entrenamiento. Unos resultados equiparables con los que obtienen una ausencia de diferencias, con respecto a ratas sedentarias, en cuanto a las concentraciones de MDA (Molnar y cols., 2006) y al contenido de restos carbonilo (Pérez y cols., 2003), tras distintos protocolos de entrenamiento. Por el contrario, en algunos modelos experimentales, también se observaron cambios, bien por la exacerbación de la peroxidación lipídica en el músculo esquelético de grupos de ratas entrenadas mediante natación durante 24 semanas (Karanth y Jeevaratnam, 2010), o bien por la caída de las concentraciones de MDA en sóleo y gastrocnemio rojo tras entrenamientos de 8 semanas (Chae y cols., 2008), y de los niveles de carbonilos proteicos en sóleo y plantar tras 6 semanas (Saengsirisuwan y cols., 2002).

En los últimos años, se ha propuesto que el entrenamiento de intensidad moderada puede disminuir los niveles basales de los indicadores de lesión oxidativa por un incremento de la resistencia al daño oxidativo (Cooper y cols., 2002), es decir, causando mejoras adaptativas de la capacidad antioxidante, lo que permite a las células afrontar en mejores condiciones la sobreproducción de radicales libres causada por el estrés oxidativo. La actividad física aguda aumenta la capacidad antioxidante del plasma en su conjunto, así como la actividad de los enzimas antioxidantes SOD, GPx, GR y catalasa en la sangre de los humanos (Berzosa y cols., 2011b) y en el tejido muscular de la rata (Salminen y Vihko, 1983; Ji y Fu,

1992); aunque también disminuye los niveles plasmáticos y musculares de algunos *scavengers*, tales como el ácido ascórbico (Koz y cols., 1992) y la vitamina E (Gohil y cols., 1987), por lo que se ha propuesto su administración para reducir los daños oxidativos generados como consecuencia del ejercicio agudo (Brady y cols., 1979; Sastre y cols., 1992). Dado que la actividad de muchas de estas enzimas antioxidantes está regulada por los niveles de oxigenación tisular (Gregory y Fridovich, 1973; Crapo y Tierney, 1974), parece posible que sesiones de ejercicio aeróbico repetidas en el tiempo pudieran mejorar la capacidad antioxidante mediada por estas enzimas, lo cual induciría a una mejor capacidad en las células para resistir la sobreproducción de radicales libres causada por el ejercicio físico (Sen, 1995; Somani y cols., 1997; Urso y Clarkson, 2003; Gómez-Cabrera y cols., 2008). Este incremento de la actividad antioxidante como respuesta adaptativa a la duración del entrenamiento podría explicar la caída en los indicadores de lesión oxidativa lipídica y proteica observados en nuestro estudio.

El hecho de que la fluidez en las membranas y mitocondrias disminuyera con la duración del entrenamiento, a la vez que el estrés oxidativo causado por el ejercicio se iba atenuando, nos lleva a pensar en otros mecanismos posibles, diferentes al de la hipótesis oxidativa, mediante los cuales el ejercicio crónico pueda modificar la fluidez de las membranas biológicas en el músculo esquelético. Una posibilidad es que el entrenamiento provoque cambios en la composición lipídica en las membranas del músculo esquelético. En este sentido, Marini y cols. (2011) concluyeron que, tras realizar entrenamientos de 10 semanas en tapiz rodante, hubo cambios significativos de la concentración de ácidos grasos trans en membranas eritrocitarias: descensos en ejercicios al 80% de intensidad del  $VO_2\text{max}$ , y aumentos si la intensidad fue del 60%. También se redujo la rigidez en la membrana eritrocitaria de caballos entrenados durante cuatro o seis semanas con una alimentación a base de una dieta enriquecida en ácidos grasos (n-3) (De Moffarts y cols., 2007; Portier y cols., 2007).

Uno de los órganos que está sometido a grandes requerimientos adaptativos durante la práctica del ejercicio físico, especialmente cuando éste es de tipo máximo, es el corazón. Su función como bomba del sistema circulatorio se consigue gracias a que está constituido fundamentalmente por fibras musculares especializadas, miocardiocitos, las cuales, a diferencia de la fibra esquelética, están controladas por el sistema nervioso vegetativo. En la determinación de la fluidez en la membrana celular y mitocondrias del músculo cardiaco los resultados fueron muy similares a los del músculo esquelético: una marcada rigidez tras el esfuerzo agudo y una disminución de la fluidez durante el entrenamiento, cuya intensidad fue mayor al aumentar su duración, especialmente en las mitocondrias. Además de nuestro



estudio, en la literatura científica, solamente se ha valorado la fluidez en la membrana de este tejido en el estudio de Pérez y cols. (2003), ya mencionado previamente para considerar el músculo esquelético. Estos autores describieron descensos en la fluidez de la membrana de las mitocondrias, tras la realización de esfuerzos agudos de carácter exhaustivo, hecho que coincide con nuestro estudio, mientras que, a diferencia de nuestros resultados, en los grupos de entrenamiento no obtuvieron cambios significativos con respecto al reposo.

Aunque el ejercicio agudo aumentó la LPO, los cambios no fueron significativos a nivel cardiaco. La literatura científica muestra resultados discrepantes en el estudio de la peroxidación lipídica cardiaca por el ejercicio físico agudo. Coincidiendo con nuestras experiencias, ratas sometidas a un protocolo agudo de larga duración, 4 horas, no modificaron sus concentraciones de MDA respecto al reposo (Vitiello y cols., 2011). Sin embargo, otros autores han observado aumentos significativos de las concentraciones de MDA en ratas sometidas a esfuerzo agudo en tapiz rodante o tras 30 minutos de natación (Turgut y cols., 2003; Lin y cols., 2006; Wonders y cols., 2007; Huang y cols., 2008).

El entrenamiento tampoco modificó de forma significativa el grado de peroxidación lipídica cardiaca. En concordancia con nuestros resultados, no se describieron cambios en ratas que realizaron: un programa de entrenamiento en tapiz rodante de 12 ó 14 semanas (Morán y cols., 2004); carrera voluntaria en rueda desde los 11 a los 24 meses de edad (Judge y cols., 2005); y natación durante 8 semanas, ya fuera con o sin suplementos de vitamina E (Metin y cols., 2002). Aunque también hay estudios discrepantes, como los que obtienen aumentos de la LPO tras 8 semanas de entrenamiento en tapiz (Liu y cols., 2000) y 4 semanas de natación (Misra y cols., 2009), y los descensos de las concentraciones de MDA, tras un entrenamiento de 8 semanas con tapiz (Husain y Hazelrigg, 2002; Husain, 2003; Husain, 2004).

Respecto a la carbonilación proteica en el músculo cardiaco, obtuvimos aumentos significativos al comparar el ejercicio agudo con el reposo, coincidentes con los de Pérez y cols. (2003), bajo condiciones experimentales equiparables a las nuestras. Por el contrario, en nuestro estudio, el entrenamiento, con independencia de su duración, no modificó significativamente la carbonilación proteica, resultados que están en la misma línea que los obtenidos en otros trabajos que relacionaron el daño oxidativo a las proteínas y el entrenamiento (Liu y cols., 2000; Husain y Hazelrigg, 2002; Husain, 2003; Pérez y cols., 2003; Morán y cols., 2004; Judge y cols., 2005).

Las discrepancias en la respuesta de los indicadores de lesión oxidativa en lípidos y proteínas entre el músculo esquelético y el cardiaco podrían relacionarse con una respuesta

diferente en el sistema defensivo antioxidante. Así, en animales sedentarios en reposo, la actividad antioxidante en el músculo cardiaco de las enzimas SOD, catalasa y GPx casi duplica la del esquelético (Husain y cols., 1996), lo que podría suponer una mejor condición para el desarrollo del entrenamiento físico en el músculo cardiaco respecto del esquelético. En este sentido, no se describieron cambios significativos en la actividad de la Mn-SOD, catalasa, GPx y GR en el corazón de la rata inducidos por el entrenamiento, a diferencia de lo que sucede en otros órganos (Somani y cols., 1995a).

El ejercicio físico no sólo requiere una adaptación funcional local de las fibras musculares implicadas en el desempeño de la actividad física, sino que, además, precisa de la respuesta coordinada de la casi totalidad de los sistemas y aparatos corporales. El hígado es un órgano donde se desarrollan muchos de los procesos metabólicos que se requieren para asegurar un adecuado aporte energético durante la actividad física. Además, su papel en el aclaramiento y catabolismo de numerosos productos de desecho generados durante la contracción muscular es esencial para mantener la homeostasis, por lo que consideramos que constituye un territorio óptimo para valorar la afectación sistémica que el ejercicio físico puede producir en las membranas biológicas y el estrés oxidativo.

Tanto el ejercicio agudo como el entrenamiento no modificaron la fluidez en la membrana celular de los hepatocitos. Por el contrario, a nivel mitocondrial, principal organela implicada en los procesos energéticos y metabólicos celulares, el ejercicio agudo exhaustivo provocó rigidez, al igual que después del entrenamiento, especialmente cuando su duración fue de cuatro semanas. En la literatura científica, es llamativo el escaso número de trabajos que valoran los efectos del ejercicio físico en la fluidez de las membranas hepáticas. En un estudio que valoró los efectos combinados en dos grupos de edad, 9 y 20 meses, y del ejercicio físico en la fluidez de membranas microsómicas y mitocondriales hepáticas de la rata, se observó que, en relación a animales sedentarios, éste presentó un efecto fluidificante en ambas, concretamente a nivel mitocondrial en las ratas de 9 meses y microsómico en las de 20 meses de edad (Kim y cols., 1996). También se han estudiado los efectos de la ingesta de aceite de oliva o de girasol en la fluidez de la membrana mitocondrial en ratas, tras un entrenamiento de 8 semanas de duración en tapiz rodante, sin que se hayan obtenido cambios significativos causados por el entrenamiento (Quiles y cols., 1999).

Un hecho importante es que el ejercicio físico agudo indujo una marcada peroxidación lipídica en el hígado, que, además, fue exacerbada con el entrenamiento, estableciéndose una clara relación entre la duración de la actividad física y el grado del daño oxidativo. En la literatura científica, en casi todos los modelos experimentales, el ejercicio agudo indujo una

marcada peroxidación lipídica hepática (Liu y cols., 2000; Turgut y cols., 2003; Kon y cols., 2007; Huang y cols., 2008 y 2009; Korivi y cols., 2012), incluso cuando el esfuerzo agudo lo realizaban animales entrenados durante 4 semanas (Choi y Cho, 2007). La excepción se obtuvo al aplicar un protocolo de esfuerzo máximo, donde no se registraron cambios significativos respecto a ratas controles (de Oliveira y cols., 2003). Al igual que en nuestro estudio, hubo un incremento, respecto a animales sedentarios, en el estrés oxidativo causado por el entrenamiento tras un programa de ejercicio de endurance de 8 semanas, tanto en ratas de 3 como de 18 meses (Mallikarjuna y cols., 2009; Sun y cols., 2010), y tras una planificación de ejercicios de natación durante 4 semanas (Misra y cols., 2009). Por el contrario, otros autores no obtuvieron cambios significativos en las concentraciones de MDA producidos en determinados programas de entrenamiento (Liu y cols., 2000; Metin y cols., 2002; Choi y Cho, 2007; Boveris y Navarro, 2008), incluso cuando se modificó la dieta de los animales, enriqueciéndola con grasas hidrogenadas o con aceite de cacahuete (Karanth y Jeevaratnam, 2010); mientras que, en un programa de 8 semanas de natación, el tratamiento concomitante con dietas ricas en aceite de maíz y genisteína redujo las concentraciones de TBARS en ratas envejecidas (Eksakulka y cols., 2009).

Al igual que sucedía con la peroxidación lipídica, el ejercicio físico agudo y el entrenamiento también indujeron lesión oxidativa a las proteínas en los homogeneizados hepáticos. Mientras ejercicios de natación agudos llevados al extremo de la extenuación también produjeron una marcada carbonilación en homogeneizados hepáticos de rata (Korivi y cols., 2012), otros estudios no han detectado carbonilación hepática, a pesar de seguir protocolos máximos como el nuestro (Liu y cols., 2000; de Oliveira, 2003). Por el contrario, en programas de entrenamiento de 8 a 24 semanas, se han obtenido descensos del contenido de carbonilos proteicos de homogeneizados hepáticos (Liu y cols., 2000; Boveris y Navarro, 2008; Teodoro y cols., 2012), o pequeños cambios no significativos (Witt y cols., 1992).

Además del hígado, otro tejido donde valoramos los efectos sistémicos del ejercicio físico en la fluidez de las membranas fue el del sistema nervioso central. Éste es clave para valorar los efectos tóxicos de los radicales libres, ya que es especialmente vulnerable por contener elevadas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, los más susceptibles de lesión durante la reacción de la LPO; por poseer un flujo sanguíneo muy elevado, y utilizar, por tanto, una enorme cantidad de oxígeno para producir ATP; y, finalmente, por su pobreza en enzimas antioxidantes. Por ejemplo, en la rata, en comparación con el hígado, la actividad de la catalasa es de tan sólo un veinteavo, mientras que las de la SOD y la GPx es de apenas un tercio (Husain y cols., 1996).

Atendiendo a nuestros resultados, el ejercicio físico, ya sea agudo hasta la extenuación o un entrenamiento de diferentes periodos de duración, redujo significativamente la fluidez en los sinaptosomas. Esta marcada rigidez, que no se apreció a nivel hepático, puede deberse a la mayor sensibilidad que tiene el tejido nervioso al estrés oxidativo y a la redistribución de flujo sanguíneo que el ejercicio provoca. La hiperemia muscular, durante la actividad física, se logra no sólo a través de un aumento del gasto cardiaco y de los mecanismos adaptativos de la microcirculación muscular, sino también reduciendo el flujo sanguíneo en territorios tales como los dependientes de la circulación esplácnica, que incluye la hepática. En cambio, el flujo de la circulación cerebral tiende a mantenerse constante durante la actividad física, hecho que, sin duda, puede contribuir a limitar el acceso al hígado, vía hemática, de muchas EROS y mantener, o incluso aumentar ligeramente, las que recibe el tejido nervioso central. Nuestros resultados discrepan con los de un estudio previo, también realizado en la rata, que valoró los efectos de una prueba individual aguda hasta la extenuación en diversas localizaciones encefálicas, mediante espectrometría de resonancia del *spin* de los electrones. A excepción del troncoencéfalo, donde se obtuvo un aumento de la fluidez, en el resto de territorios no hubo cambios significativos en los sinaptosomas (Hiramatsu y cols., 1993). Asimismo, en otro estudio realizado en ratones, tras nueve semanas de entrenamiento, tampoco se modificó la fluidez en los sinaptosomas (Ren y cols., 2010).

A nivel mitocondrial, nuestras observaciones son las únicas que valoran los efectos del ejercicio físico en el tejido nervioso. A este nivel, y a diferencia de lo que sucedió en el hígado, ni el ejercicio agudo ni el entrenamiento produjeron cambios significativos. La diferente respuesta sistémica al ejercicio entre el tejido nervioso central y el hepático puede comprenderse si se compara la gran actividad metabólica que desarrolla el hígado depurando multitud de productos de desecho generados durante la contracción muscular y, en especial, el papel central de la mitocondria hepática en el catabolismo de estas sustancias, un proceso que puede llevar asociada la formación de importantes cantidades de radicales libres. Por el contrario, la función de la mitocondria en el tejido nervioso tan sólo se limita a asegurar a las neuronas una producción de ATP lo más constante posible, con independencia del grado de actividad física desarrollada.

Al igual que en nuestro estudio, el ejercicio físico agudo aumentó el nivel de peroxidación lipídica en el estriado de ratas que realizaron una ergometría de tipo máximo (Somani y cols., 1996), o natación durante 30 minutos (Akil y cols., 2011); en otras ocasiones, los cambios que se produjeron no fueron estadísticamente significativos (Liu y cols., 2000; de Oliveira y cols., 2003; Turgut y cols., 2003; Aksu y cols., 2009). Respecto al entrenamiento,

varios estudios en rata y ratón concluyeron, al igual que nosotros, que entrenamientos de diferente duración no muestran cambios significativos: 12 días (Brocardo y cols., 2012), 6 semanas y media (Coşkun y cols., 2005), 2 meses (Ogonovszky y cols., 2005; Ozkaya y cols., 2007; Aksu y cols., 2009; Tuon y cols., 2010), 9 semanas (Radák y cols., 2001) ó 3 meses (Santin y cols., 2011). En otros trabajos, el entrenamiento produjo descensos significativos: 6 semanas y media (Husain y Somani, 1998), 8 (Liu y cols., 2000) ó 24 (Boveris y Navarro, 2008). Por otra parte, Misra y cols. (2009) observaron que un entrenamiento de natación de 4 semanas provocó un aumento intenso de las concentraciones de TBARS en el sistema nervioso.

Respecto al daño oxidativo a proteínas, no hemos observado cambios significativos tras el ejercicio agudo máximo o los periodos de entrenamiento. Igualmente, tampoco se han observado cambios ni en homogeneizados totales ni en mitocondrias cerebrales tras esfuerzo agudo o entrenamiento (Liu y cols., 2000; Toldy y cols., 2005; Lappalainen y cols., 2010; Tuon y cols., 2010; Brocardo y cols., 2012), si bien los resultados del entrenamiento discrepan con otros estudios, posiblemente por la gran variabilidad de programas de entrenamiento utilizados (Radák y cols., 2001; de Oliveira y cols., 2003; Ogonovszky y cols., 2005; Boveris y Navarro, 2008; Szabo y cols., 2010; Santin y cols., 2011). Cabe reseñar que, mientras el ejercicio agudo tuvo efectos diversos sobre la actividad antioxidante enzimática en el tejido nervioso, con descensos de la SOD en la corteza cerebral, aumentos de la catalasa en corteza y estriado, y aumentos y descensos de la GPx en la corteza y estriado, respectivamente (Somani y cols., 1996); el entrenamiento aumentó la actividad enzimática antioxidante, y, en especial, la de la SOD en cerebro medio y estriado (Somani y cols., 1995b). Por otra parte, el entrenamiento mejoró la relación GSH/GSSG en el cerebro medio y en la corteza cerebral, un efecto que se debe fundamentalmente al descenso de los niveles de GSSG con mantenimiento del GSH (Somani y cols., 1995b).

Estas respuestas adaptativas durante el entrenamiento, en el sistema nervioso central, podrían contribuir a sus efectos beneficiosos, que nosotros hemos observado en los homogeneizados del tejido nervioso central, manteniendo unos niveles de peroxidación lipídica y oxidación proteica similares o, incluso, ligeramente inferiores a los obtenidos en los controles.



## 7. CONCLUSIONES



En líneas generales, el ejercicio físico disminuyó la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales aisladas de los tejidos muscular, hepático y nervioso central, e indujo estrés oxidativo en homogeneizados de estos órganos. Como conclusiones, establecemos las siguientes:

1. El ejercicio agudo hasta la extenuación causó una marcada rigidez en la membrana celular y mitocondrial de los músculos esquelético y cardíaco. Los aumentos de la oxidación mediada por radicales libres en lípidos y proteínas pueden ser los responsables, al menos parcialmente, de la rigidez en las membranas musculares.
2. La actividad muscular aguda causó oxidación de lípidos y proteínas en el hígado y peroxidación lipídica en el sistema nervioso central. A nivel hepático sólo se observó rigidez significativa en la mitocondria. En el tejido nervioso, su mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica fue, en buena medida, responsable de la rigidez observada en la membrana celular, sin que hubiera cambios significativos a nivel mitocondrial.
3. El entrenamiento redujo la fluidez en las membranas celulares y mitocondriales musculares de forma directamente proporcional a su duración. Los niveles de oxidación lipídica y proteica, en términos generales, fueron menores que los alcanzados tras un ejercicio agudo hasta la extenuación.
4. Tanto la peroxidación lipídica como la carbonilación en los homogeneizados del músculo esquelético tuvieron una clara tendencia a reducirse al aumentar la duración del entrenamiento, posiblemente por una mejora de las defensas antioxidantes. Estos resultados sugieren que la rigidez en las membranas musculares asociada al entrenamiento se debió a otras causas diferentes al estrés oxidativo.
5. El entrenamiento indujo rigidez en las membranas mitocondriales hepáticas y en las celulares del tejido nervioso. Mientras que en el hígado la lesión oxidativa fue alta en lípidos y proteínas, posiblemente como consecuencia de su mayor actividad metabólica, en el cerebro el entrenamiento tuvo un marcado efecto beneficioso, en términos de reducción de la peroxidación lipídica, hecho que pudiera deberse a un incremento adaptativo de las defensas antioxidantes producido por el ejercicio aeróbico regular.







## 7. CONCLUSIONS



In general, physical exercise decreased cellular and mitochondrial membranes fluidity from muscular, hepatic and central nervous tissues, and oxidative stress was induced in these organ homogenates. We determine the following conclusions:

- First:** Acute exercise until exhaustion caused a marked rigidity on cellular and mitochondrial membranes in skeletal and cardiac muscles. Increases in free radicals-mediated oxidation in lipids and proteins can be responsible for muscular membranes rigidity, at least, partially.
- Second:** Acute muscular activity caused lipid and protein oxidation in liver, and lipid peroxidation in the central nervous system. A significant rigidity in mitochondria was just observed at hepatic level. In the nervous tissue, its higher susceptibility to lipid peroxidation was, in large part, responsible for rigidity observed on cellular membrane, without significant changes at mitochondrial level.
- Third:** Training reduced fluidity on cellular and mitochondrial membranes in muscle in a directly proportional way to its length. Lipid and protein oxidation levels, generally speaking, were less than reached after exhaustive acute exercise.
- Fourth:** Both, lipid peroxidation and carbonylation in skeletal muscle homogenates, they had a clear tendency to reduction when training duration was increased, maybe because of antioxidant defenses improvement. These results suggest that muscular membranes rigidity associated to training was due to other different causes from oxidative stress.
- Fifth:** Training induced rigidity on hepatic mitochondrial and nervous cellular membranes. While oxidative injury in liver was high in lipids and proteins, maybe as consequence of its higher metabolic activity, training had a marked beneficial effect in brain, related to lipid peroxidation reduction, which could be due to an antioxidant defenses adaptive increase, produced by regular aerobic exercise.





## **8. BIBLIOGRAFÍA**



- Akil, M., M. Bicer, y cols. (2011). "Selenium supplementation prevents lipid peroxidation caused by arduous exercise in rat brain tissue." Bratisl Lek Listy **112**(6): 314-7.
- Aksu, I., A. Topcu, y cols. (2009). "Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum." Neurosci Lett **452**(3): 281-5.
- Albertini, R., S. Rindi, y cols. (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." Arch Biochem Biophys **327**(2): 209-14.
- Alessio, H. M. y A. H. Goldfarb (1988). "Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training." J Appl Physiol **64**(4): 1333-6.
- Alessio, H. M., A. E. Hagerman, y cols. (2000). "Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise." Med Sci Sports Exerc **32**(9): 1576-81.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, y cols. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-22.
- Anderson, E. J. y P. D. Neuffer (2006). "Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation." Am J Physiol Cell Physiol **290**(3): C844-51.
- Andre, A., E. Chanseume, et al. (2006). "Cerebral plasmalogens and aldehydes in senescence-accelerated mice P8 and R1: a comparison between weaned, adult and aged mice." Brain Res **1085**(1): 28-32.
- Anson, R. M., P. A. Mason, y cols. (2006). "Gene-specific and mitochondrial repair of oxidative DNA damage." Methods Mol Biol **314**: 155-81.
- Anzueto, A., F. H. Andrade, y cols. (1992). "Resistive breathing activates the glutathione redox cycle and impairs performance of rat diaphragm." J Appl Physiol **72**(2): 529-34.
- Aslan, M. y T. Ozben (2003). "Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways." Antioxid Redox Signal **5**(6): 781-8.
- Avery, N. G., J. L. Kaiser, y cols. (2003). "Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise." J Strength Cond Res **17**(4): 801-9.
- Babior, B. M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts)." N Engl J Med **298**(12): 659-68.
- Baenziger, J. E., M. L. Morris, y cols. (2000). "Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor." J Biol Chem **275**(2): 777-84.
- Baker, J. S., D. M. Bailey, y cols. (2004). "Metabolic implications of resistive force selection for oxidative stress and markers of muscle damage during 30 s of high-intensity exercise." Eur J Appl Physiol **92**(3): 321-7.
- Balon, T. W. y J. L. Nadler (1994). "Nitric oxide release is present from incubated skeletal



- muscle preparations." J Appl Physiol **77**(6): 2519-21.
- Barclay, J. K. y M. Hansel (1991). "Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue." Can J Physiol Pharmacol **69**(2): 279-84.
- Beckman, J. S. y W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-37.
- Beckman, K. B. y B. N. Ames (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiol Rev **78**(2): 547-81.
- Beckmann, J. S., Y. Z. Ye, y cols. (1994). "Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry." Biol Chem Hoppe Seyler **375**(2): 81-8.
- Berne, R. M., M. N. Levy, y cols. (2009). Fisiología. Barcelona, Elsevier España.
- Berzosa, C., E. M. Gomez-Trullen, y cols. (2011a). "Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans." Eur J Appl Physiol **111**(6): 1127-33.
- Berzosa, C., I. Cebrian, y cols. (2011b). "Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men." J Biomed Biotechnol **2011**: 540458.
- Blair, S. N., Y. Cheng, y cols. (2001). "Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits?" Med Sci Sports Exerc **33**(6 Suppl): S379-99; discussion S419-20.
- Bloomer, R. J. y K. H. Fisher-Wellman (2008). "Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake." Gen Med **5**(3): 218-28.
- Bosca, L., M. Zeini, y cols. (2005). "Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate." Toxicology **208**(2): 249-58.
- Boveris, A., N. Oshino, y cols. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." Biochem J **128**(3): 617-30.
- Boveris, A. y B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-16.
- Boveris, A. y A. Navarro (2008). "Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents." Free Radic Biol Med **44**(2): 224-9.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brady, P. S., L. J. Brady, y cols. (1979). "Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat." J Nutr **109**(6): 1103-9.
- Bredt, D. S., C. E. Glatt, y cols. (1991). "Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase." Neuron **7**(4): 615-24.

- Breen, A. P. y J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Radic Biol Med **18**(6): 1033-77.
- Brocardo, P. S., F. Boehme, y cols. (2012). "Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise." Neuropharmacology **62**(4): 1607-18.
- Bruch, R. C. y W. S. Thayer (1983). "Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes." Biochim Biophys Acta **733**(2): 216-22.
- Bryant, R. J., J. Ryder, y cols. (2003). "Effects of vitamin E and C supplementation either alone or in combination on exercise-induced lipid peroxidation in trained cyclists." J Strength Cond Res **17**(4): 792-800.
- Brzezczynska, J. y K. Gwozdinski (2008). "Nitric oxide induced oxidative changes in erythrocyte membrane components." Cell Biol Int **32**(1): 114-20.
- Brzezczynska, J., A. Pieniazek, y cols. (2008). "Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise." Appl Physiol Nutr Metab **33**(6): 1223-31.
- Butterfield, T. A., T. M. Best, y cols. (2006). "The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair." J Athl Train **41**(4): 457-65.
- Cadenas, E., A. Boveris, y cols. (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." Arch Biochem Biophys **180**(2): 248-57.
- Caillaud, C., G. Py, y cols. (1999). "Antioxidants and mitochondrial respiration in lung, diaphragm, and locomotor muscles: effect of exercise." Free Radic Biol Med **26**(9-10): 1292-9.
- Chae, C. H., C. H. Shin, y cols. (2008). "The combination of alpha-lipoic acid supplementation and aerobic exercise inhibits lipid peroxidation in rat skeletal muscles." Nutr Res **28**(6): 399-405.
- Cheeseman, K. H. y T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." Br Med Bull **49**(3): 481-93.
- Chen, J. J. y B. P. Yu (1994). "Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products." Free Radic Biol Med **17**(5): 411-8.
- Cherednichenko, G., A. V. Zima, y cols. (2004). "NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release." Circ Res **94**(4): 478-86.
- Chevion, S., D. S. Moran, y cols. (2003). "Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5119-23.
- Chiarugi, P., G. Pani, y cols. (2003). "Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK

- tyrosine phosphatase is required for cell adhesion." J Cell Biol **161**(5): 933-44.
- Childs, A., C. Jacobs, y cols. (2001). "Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise." Free Radic Biol Med **31**(6): 745-53.
- Choi, E. Y. y Y. O. Cho (2007). "The effects of physical training on antioxidative status under exercise-induced oxidative stress." Nutr Res Pract **1**(1): 14-8.
- Coombes, J. S., B. Rowell, y cols. (2002). "Effects of vitamin E deficiency on fatigue and muscle contractile properties." Eur J Appl Physiol **87**(3): 272-7.
- Cooper, C. E., N. B. Volvaard, y cols. (2002). "Exercise, free radicals and oxidative stress." Biochem Soc Trans **30**(2): 280-5.
- Cooper, T. G. y D. W. Hamilton (1977). "Phagocytosis of spermatozoa in the terminal region and gland of the vas deferens of the rat." Am J Anat **150**(2): 247-67.
- Coreil, J., C. A. Bryant, y cols. (2001). Health behavior in developing countries. En Social and behavioral foundations of public health. J. Coreil, C. A. Bryant, J. N. Henderson, M. S. Fortofoer y G. P. Quinn (editores). Thousand Oaks, USA, Sage Publications, Inc.
- Coskun, S., B. Gonul, y cols. (2005). "The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats." Mol Cell Biochem **280**(1-2): 135-8.
- Crapo, J. D. y D. F. Tierney (1974). "Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity." Am J Physiol **226**(6): 1401-7.
- Criswell, D., S. Powers, y cols. (1993). "High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity." Med Sci Sports Exerc **25**(10): 1135-40.
- Cross, A. R. y O. T. Jones (1991). "Enzymic mechanisms of superoxide production." Biochim Biophys Acta **1057**(3): 281-98.
- Curtis, M. T., D. Gilfor, y cols. (1984). "Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes." Arch Biochem Biophys **235**(2): 644-9.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, y cols. (2001). "The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself." Free Radic Biol Med **31**(12): 1624-32.
- Davies, K. J., A. T. Quintanilha, y cols. (1982a). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-205.
- Davies, K. J., J. J. Maguire, y cols. (1982b). "Muscle mitochondrial bioenergetics, oxygen supply, and work capacity during dietary iron deficiency and repletion." Am J Physiol **242**(6): E418-27.
- Davies, K. J., A. Sevanian, y cols. (1986). "Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid." Biochem J **235**(3): 747-54.

- Davies, K. J., M. E. Delsignore, y cols. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids." J Biol Chem **262**(20): 9902-7.
- Davies, K. J. y A. L. Goldberg (1987). "Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes." J Biol Chem **262**(17): 8220-6.
- Davies, M. J. (2003). "Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 761-70.
- Dawson, B., G. J. Henry, y cols. (2002). "Effect of Vitamin C and E supplementation on biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after a 21 km run." Int J Sports Med **23**(1): 10-5.
- de Grey, A. D. (2003). "A hypothesis for the minimal overall structure of the mammalian plasma membrane redox system." Protoplasma **221**(1-2): 3-9.
- De Moffarts, B., K. Portier, y cols. (2007). "Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses." Vet J **174**(1): 113-21.
- de Oliveira, S. L., D. B. Diniz, y cols. (2003). "Carbohydrate-energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance." Br J Nutr **89**(1): 89-96.
- Dean, R. T., S. Fu, y cols. (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation." Biochem J **324** ( Pt 1): 1-18.
- Demple, B. y J. Halbrook (1983). "Inducible repair of oxidative DNA damage in Escherichia coli." Nature **304**(5925): 466-8.
- Diaz, P. T., E. Brownstein, y cols. (1994). "Effects of N-acetylcysteine on in vitro diaphragm function are temperature dependent." J Appl Physiol **77**(5): 2434-9.
- Dillard, C. J., R. E. Litov, y cols. (1978). "Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation." J Appl Physiol **45**(6): 927-32.
- Dizdaroglu, M. (1993). "Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry." FEBS Lett **315**(1): 1-6.
- Dobretsov, G. E., T. A. Borschevskaya, y cols. (1977). "The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation." FEBS Lett **84**(1): 125-8.
- Ducrocq, C., B. Blanchard, y cols. (1999). "Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent." Cell Mol Life Sci **55**(8-9): 1068-77.
- Dumas, D., S. Muller, y cols. (1997). "Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched erythrocyte membrane." Arch Biochem Biophys **341**(1): 34-9.
- Duthie, G. G., J. D. Robertson, y cols. (1990). "Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running." Arch Biochem Biophys **282**(1): 78-83.
- Eksakulkla, S., D. Suksom, y cols. (2009). "Increased NO bioavailability in aging male

- rats by genistein and exercise training: using 4, 5-diaminofluorescein diacetate." Reprod Biol Endocrinol **7**: 93.
- Elfering, S. L., T. M. Sarkela, y cols. (2002). "Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **277**(41): 38079-86.
- Espinosa, A., A. Leiva, y cols. (2006). "Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited Ca<sup>2+</sup> stimulates ERK, CREB, early genes." J Cell Physiol **209**(2): 379-88.
- Esterbauer, H. y K. H. Cheeseman (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods Enzymol **186**: 407-21.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur, y cols. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**(1): 81-128.
- Fenton, H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." J Chem Soc Trans **65**(899).
- Ferrington, D. A., J. C. Reijneveld, y cols. (1996). "Activation of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase induced by exercise." Biochim Biophys Acta **1279**(2): 203-13.
- Fischkoff, S. y J. M. Vanderkooi (1975). "Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene." J Gen Physiol **65**(5): 663-76.
- Fraga, C. G., M. K. Shigenaga, y cols. (1990). "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4533-7.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action." Am J Med **97**(3A): 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Fridovich, I. (1978). "Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle." Photochem Photobiol **28**(4-5): 733-41.
- Funes, L., L. Carrera-Quintanar, y cols. (2010). "Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils' oxidative stress in chronic exercise." Eur J Appl Physiol **111**(4): 695-705.
- Gaeini, A. A., N. Rahnema, y cols. (2006). "Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress at rest and after exercise to exhaustion in athletic students." J Sports Med Phys Fitness **46**(3): 458-61.
- García Morales, M. C. (2007). Efectos de la melatonina, coenzima Q10 y Phlebotidium Decumanum sobre el estrés oxidativo en el ejercicio físico intenso. Tesis Doctoral presentada en el Departamento de Enfermería. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Granada, Universidad de Granada.
- Garzetti, G. G., A. L. Tranquilli, y cols. (1993). "Altered lipid composition, increased lipid peroxidation, and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage

- in preeclampsia." Obstet Gynecol **81**(3): 337-40.
- Getchell, L. H. y J. C. Moore (1975). "Physical training: comparative responses of middle-aged adults." Arch Phys Med Rehabil **56**(6): 250-4.
- Giulivi, C. y K. J. Davies (1990). "A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin." J Biol Chem **265**(32): 19453-60.
- Goeptar, A. R., H. Scheerens, y cols. (1995). "Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450." Crit Rev Toxicol **25**(1): 25-65.
- Gohil, K., L. Rothfuss, y cols. (1987). "Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content." J Appl Physiol **63**(4): 1638-41.
- Goldfarb, A. H., M. K. McIntosh, y cols. (1994). "Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats." J Appl Physiol **76**(4): 1630-5.
- Gómez-Cabrera, M. C., F. V. Pallardo, y cols. (2003). "Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France." JAMA **289**(19): 2503-4.
- Gómez-Cabrera, M. C., E. Domenech, y cols. (2008). "Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training." Free Radic Biol Med **44**(2): 126-31.
- Gong, M. C., S. Arbogast, y cols. (2006). "Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells." J Appl Physiol **100**(2): 399-405.
- Graham, J. M. (1997). Homogenization of tissues and cells. En Subcellular fractionation: A practical approach. J. M. Graham y D. Rickwood (editores). Oxford, UK, Oxford University Press (IRL Press imprint): 1-29.
- Granger, D. N., G. Rutili, y cols. (1981). "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia." Gastroenterology **81**(1): 22-9.
- Greenwald, R. A. y W. W. Moy (1980). "Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid." Arthritis Rheum **23**(4): 455-63.
- Gregory, E. M. y I. Fridovich (1973). "Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen." J Bacteriol **114**(2): 543-8.
- Grisham, M. B., D. Jour'd'Heuil, y cols. (1999). "Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): G315-21.
- Grootveld, M., E. B. Henderson, y cols. (1991). "Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy." Biochem J **273**(Pt 2): 459-67.
- Gutteridge, J. M. y B. Halliwell (1989). "Iron toxicity and oxygen radicals." Baillieres Clin Haematol **2**(2): 195-256.

- Gutteridge, J. M. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." Clin Chem **41**(12 Pt 2): 1819-28.
- Guyton, A. C. y J. E. Hall (2006). Textbook of Medical Physiology. Oxford, UK, Elsevier Science.
- Haber, F. y J. Weiss (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." Proc R Soc London **147**: 332-351.
- Halliwell, B. (1990). "How to characterize a biological antioxidant." Free Radic Res Commun **9**(1): 1-32.
- Halliwell, B. y J. M. Gutteridge (1990a). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol **186**: 1-85.
- Halliwell, B. y J. M. Gutteridge (1990b). "The antioxidants of human extracellular fluids." Arch Biochem Biophys **280**(1): 1-8.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease." Am J Med **91**(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1993). "The chemistry of free radicals." Toxicol Ind Health **9**(1-2): 1-21.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" Lancet **344**(8924): 721-4.
- Halliwell, B., R. Aeschbach, y cols. (1995). "The characterization of antioxidants." Food Chem Toxicol **33**(7): 601-17.
- Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" J Neurochem **97**(6): 1634-58.
- Halliwell, B. y J. M. C. Gutteridge (2007). Free radicals in Biology and Medicine. Oxford, UK, Oxford University Press.
- Hammeren, J., S. Powers, y cols. (1992). "Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats." Int J Sports Med **13**(5): 412-6.
- Hardeland, R., B. Poeggeler, y cols. (2003). "Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage." J Pineal Res **34**(1): 17-25.
- Hardeland, R. (2009). "Neuroprotection by radical avoidance: search for suitable agents." Molecules **14**(12): 5054-102.
- Harman, D. (1972). "The biologic clock: the mitochondria?" J Am Geriatr Soc **20**(4): 145-7.
- Headlam, H. A. y M. J. Davies (2003). "Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals." Free Radic Biol Med **34**(1): 44-55.
- Heron, D. S., M. Shinitzky, y cols. (1980). "Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7463-7.
- Heunks, L. M., H. A. Machiels, y cols. (2001). "Free radicals in hypoxic rat diaphragm contractility: no role for xanthine oxidase." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(6): L1402-12.
- Hickson, R. C., C. Kanakis, Jr., y cols. (1982). "Reduced training duration effects on

- aerobic power, endurance, and cardiac growth." J Appl Physiol **53**(1): 225-9.
- Hidalgo, C., G. Sanchez, y cols. (2006). "A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S - glutathionylation." J Biol Chem **281**(36): 26473-82.
- Higuchi, M., L. J. Cartier, y cols. (1985). "Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise." J Gerontol **40**(3): 281-6.
- Hill, A. V., C. N. H. Long, y cols. (1924). "Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilisation of oxygen." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character **97**(681): 84-138.
- Hiramatsu, M., R. Edamatsu, y cols. (1993). "Exhaustive exercise affects fluidity and alpha-tocopherol levels in brain synaptosomal membranes of normal and vitamin E supplemented rats." Neurochem Res **18**(3): 313-6.
- Hirschfield, W., M. R. Moody, y cols. (2000). "Nitric oxide release and contractile properties of skeletal muscles from mice deficient in type III NOS." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(1): R95-R100.
- Hodgson, E., Ed. (2004). A textbook of modern Toxicology. Hoboken, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Houslay, M. D. (1985). "Regulation of adenylate cyclase (EC 4.6.1.1) activity by its lipid environment." Proc Nutr Soc **44**(2): 157-65.
- Huang, C. C., S. C. Tsai, y cols. (2008). "Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats." Exp Gerontol **43**(6): 571-7.
- Huang, C. C., T. J. Lin, y cols. (2009). "Protective effects of L-arginine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in young rat tissues." Chin J Physiol **52**(5): 306-15.
- Hunt, J. V., J. A. Simpson, y cols. (1988). "Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins." Biochem J **250**(1): 87-93.
- Husain, K., S. N. Dube, y cols. (1996). "Effect of topically applied sulphur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats." J Appl Toxicol **16**(3): 245-8.
- Husain, K. y S. M. Somani (1998). "Effect of exercise training and chronic ethanol ingestion on cholinesterase activity and lipid peroxidation in blood and brain regions of rat." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **22**(2): 411-23.
- Husain, K. y S. R. Hazelrigg (2002). "Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart." Biochim Biophys Acta **1587**(1): 75-82.
- Husain, K. (2003). "Interaction of physical training and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure, nitric oxide, and oxidants/antioxidants in the rat heart." Pharmacol Res **48**(3): 253-61.
- Husain, K. (2004). "Interaction of regular exercise and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure and rat aortic



- antioxidants." Biochim Biophys Acta **1688**(1): 18-25.
- Imlay, J. A., S. M. Chin, y cols. (1988). "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro." Science **240**(4852): 640-2.
- Jackson, M. J., D. A. Jones, y cols. (1983). "Vitamin E and skeletal muscle." Ciba Found Symp **101**: 224-39.
- Jackson, M. J., R. H. Edwards, y cols. (1985). "Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle." Biochim Biophys Acta **847**(2): 185-90.
- Jackson, M. J. (2005). "Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1464): 2285-91.
- Janero, D. R. (1990). "Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury." Free Radic Biol Med **9**(6): 515-40.
- Janssen, Y. M., B. Van Houten, y cols. (1993). "Cell and tissue responses to oxidative damage." Lab Invest **69**(3): 261-74.
- Javesghani, D., S. A. Magder, y cols. (2002). "Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles." Am J Respir Crit Care Med **165**(3): 412-8.
- Jenkins, R. R., R. Friedland, y cols. (1984). "The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle." Int J Sports Med **5**(1): 11-4.
- Ji, L. L., F. W. Stratman, y cols. (1988). "Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise." Arch Biochem Biophys **263**(1): 150-60.
- Ji, L. L. y R. Fu (1992). "Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide." J Appl Physiol **72**(2): 549-54.
- Ji, L. L., R. Fu, y cols. (1992). "Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity." J Appl Physiol **73**(5): 1854-9.
- Ji, L. L. (1993). "Antioxidant enzyme response to exercise and aging." Med Sci Sports Exerc **25**(2): 225-31.
- Judge, S., Y. M. Jang, y cols. (2005). "Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **289**(6): R1564-72.
- Kanner, J., J. B. German, y cols. (1987). "Initiation of lipid peroxidation in biological systems." Crit Rev Food Sci Nutr **25**(4): 317-64.
- Kanter, M. M., R. L. Hamlin, y cols. (1985). "Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin." J Appl Physiol **59**(4): 1298-303.
- Kanter, P. M., G. A. Bullard, y cols. (1993). "Comparison of the cardiotoxic effects of liposomal doxorubicin (TLC D-99) versus

- free doxorubicin in beagle dogs." In Vivo **7**(1): 17-26.
- Karanth, J. y K. Jeevaratnam (2010). "Effect of carnitine supplementation on mitochondrial enzymes in liver and skeletal muscle of rat after dietary lipid manipulation and physical activity." Indian J Exp Biol **48**(5): 503-10.
- Khawli, F. A. y M. B. Reid (1994). "N-acetylcysteine depresses contractile function and inhibits fatigue of diaphragm in vitro." J Appl Physiol **77**(1): 317-24.
- Kim, J. D., R. J. McCarter, y cols. (1996). "Influence of age, exercise, and dietary restriction on oxidative stress in rats." Aging (Milano) **8**(2): 123-9.
- Kinnula, V. L., J. D. Crapo, y cols. (1995). "Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung." Lab Invest **73**(1): 3-19.
- Kobzik, L., M. B. Reid, y cols. (1994). "Nitric oxide in skeletal muscle." Nature **372**(6506): 546-8.
- Kobzik, L., B. Stringer, y cols. (1995). "Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships." Biochem Biophys Res Commun **211**(2): 375-81.
- Koçturk, S., B. M. Kayatekin, y cols. (2008). "The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats." Eur J Appl Physiol **102**(5): 515-24.
- Kon, M., F. Kimura, y cols. (2007). "Effect of Coenzyme Q10 supplementation on exercise-induced muscular injury of rats." Exerc Immunol Rev **13**: 76-88.
- Koop, D. R. (1992). "Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1." FASEB J **6**(2): 724-30.
- Korivi, M., C. W. Hou, y cols. (2012). "Ginsenoside-Rg1 Protects the Liver against Exhaustive Exercise-Induced Oxidative Stress in Rats." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 932165.
- Koz, M., D. Erbas, y cols. (1992). "Effects of acute swimming exercise on muscle and erythrocyte malondialdehyde, serum myoglobin, and plasma ascorbic acid concentrations." Can J Physiol Pharmacol **70**(10): 1392-5.
- Kramer, H. F. y L. J. Goodyear (2007). "Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle." J Appl Physiol **103**(1): 388-95.
- Kumar, C. T., V. K. Reddy, y cols. (1992). "Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress." Mol Cell Biochem **111**(1-2): 109-15.
- Lamas, S., P. A. Marsden, y cols. (1992). "Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6348-52.
- Lamprecht, M., J. F. Greilberger, y cols. (2008). "Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner." J Appl Physiol **104**(6): 1611-7.
- Lappalainen, Z., J. Lappalainen, y cols. (2010). "Exercise training and experimental diabetes modulate heat shock protein

- response in brain." Scand J Med Sci Sports **20**(1): 83-9.
- Lee, J., B. P. Yu, y cols. (1999). "Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake." Free Radic Biol Med **26**(3-4): 260-5.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, y cols. (2001). Principles of Biochemistry. Barcelona, Omega.
- Levi, M., B. M. Baird, y cols. (1990). "Cholesterol modulates rat renal brush border membrane phosphate transport." J Clin Invest **85**(1): 231-7.
- Levine, R. L., D. Garland, y cols. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **186**: 464-78.
- Levine, R. L. y E. R. Stadtman (2001). "Oxidative modification of proteins during aging." Exp Gerontol **36**(9): 1495-502.
- Li, J. X., C. W. Tong, y cols. (1999). "Changes in membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **80**(2): 113-7.
- Lin, W. T., S. C. Yang, y cols. (2006). "L-Arginine attenuates xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in hearts of rats during exhaustive exercise." Br J Nutr **95**(1): 67-75.
- Lippi, G. y N. Maffulli (2009). "Biological influence of physical exercise on hemostasis." Semin Thromb Hemost **35**(3): 269-76.
- Lipton, S. A., Y. B. Choi, y cols. (1993). "A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds." Nature **364**(6438): 626-32.
- Liu, J., H. C. Yeo, y cols. (2000). "Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants." J Appl Physiol **89**(1): 21-8.
- López Chicharro, J. y S. Aznar Laín (2004). Transición aeróbica-anaeróbica: Concepto, metodología de determinación y aplicaciones. Madrid, Master Line.
- Lowenstein, C. J. y S. H. Snyder (1992). "Nitric oxide, a novel biologic messenger." Cell **70**(5): 705-7.
- MacDougall, J. D., D. Tuxen, y cols. (1985). "Arterial blood pressure response to heavy resistance exercise." J Appl Physiol **58**(3): 785-90.
- MacMicking, J., Q. W. Xie, y cols. (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol **15**: 323-50.
- Malech, H. L. y J. I. Gallin (1987). "Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases." N Engl J Med **317**(11): 687-94.
- Mallikarjuna, K., K. Nishanth, y cols. (2009). "Effect of exercise training on ethanol-induced oxidative damage in aged rats." Alcohol **43**(1): 59-64.
- Marini, M., P. M. Abruzzo, y cols. (2011). "Aerobic training affects fatty acid composition of erythrocyte membranes." Lipids Health Dis **10**: 188.

- Matsugo, S., T. Kitagawa, y cols. (2000). "Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice." Neurosci Lett **278**(1-2): 105-8.
- Matuszczak, Y., M. Farid, y cols. (2005). "Effects of N-acetylcysteine on glutathione oxidation and fatigue during handgrip exercise." Muscle Nerve **32**(5): 633-8.
- McArdle, F., S. Spiers, y cols. (2004). "Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice." J Physiol **561**(Pt 1): 233-44.
- Mendoza Berjano, R., M. R. Sagraera Pérez, y cols. (1994). Conductas de los escolares españoles relacionadas con la salud (1986-1990). Madrid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- Metin, G., P. Atukeren, y cols. (2002). "The effect of vitamin E treatment on oxidative stress generated in trained rats." Tohoku J Exp Med **198**(1): 47-53.
- Miles, A. M., D. S. Bohle, y cols. (1996). "Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide." J Biol Chem **271**(1): 40-7.
- Millán-Plano, S., J. J. García, y cols. (2003). "Melatonin and pinoline prevent aluminium-induced lipid peroxidation in rat synaptosomes." J Trace Elem Med Biol **17**(1): 39-44.
- Miquel, J., A. C. Economos, y cols. (1980). "Mitochondrial role in cell aging." Exp Gerontol **15**(6): 575-91.
- Misra, D. S., R. Maiti, y cols. (2009). "Protection of swimming-induced oxidative stress in some vital organs by the treatment of composite extract of *Withania somnifera*, *Ocimum sanctum* and *Zingiber officinalis* in male rat." Afr J Tradit Complement Altern Med **6**(4): 534-43.
- Moldovan, L. y N. I. Moldovan (2004). "Oxygen free radicals and redox biology of organelles." Histochem Cell Biol **122**(4): 395-412.
- Molnar, A. M., S. Servais, y cols. (2006). "Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is reduced with acute and chronic eccentric exercise in rat skeletal muscle." Antioxid Redox Signal **8**(3-4): 548-58.
- Monboisse, J. C. y J. P. Borel (1992). "Oxidative damage to collagen." EXS **62**: 323-7.
- Moncada, S. y E. A. Higgs (1991). "Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance." Eur J Clin Invest **21**(4): 361-74.
- Moncada, S. y E. A. Higgs (1995). "Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide." FASEB J **9**(13): 1319-30.
- Moopanar, T. R. y D. G. Allen (2005). "Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 degrees C." J Physiol **564**(Pt 1): 189-99.
- Moran, M., J. Delgado, y cols. (2004). "Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training." Acta Physiol Scand **180**(2): 157-66.

- Moslen, M. T. (1994). "Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis." Adv Exp Med Biol **366**: 17-27.
- Motta, S., C. Letellier, y cols. (2009). "Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs as assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraoxonase-1 activity." Vet J **181**(3): 288-95.
- Nakazawa, H., C. Genka, y cols. (1996). "Pathological aspects of active oxygens/free radicals." Jpn J Physiol **46**(1): 15-32.
- Nathan, C. (2003). "Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling." J Clin Invest **111**(6): 769-78.
- Nethery, D., L. A. Callahan, y cols. (2000). "PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Appl Physiol **89**(1): 72-80.
- Nielsen, F., B. B. Mikkelsen, y cols. (1997). "Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors." Clin Chem **43**(7): 1209-14.
- Nikolaidis, M. G., A. Z. Jamurtas, y cols. (2008). "The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations." Sports Med **38**(7): 579-606.
- Nohl, H. y D. Hegner (1978). "Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?" Eur J Biochem **82**(2): 563-7.
- Ogonovszky, H., I. Berkes, y cols. (2005). "The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain." Neurochem Int **46**(8): 635-40.
- Oliver, C. N. (1987). "Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils." Arch Biochem Biophys **253**(1): 62-72.
- O'Neill, C. A., C. L. Stebbins, y cols. (1996). "Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats." J Appl Physiol **81**(3): 1197-206.
- Orlander, J., K. H. Kiessling, y cols. (1977). "Low intensity training, inactivity and resumed training in sedentary men." Acta Physiol Scand **101**(3): 351-62.
- Ozkaya, Y. G., A. Agar, y cols. (2007). "Exercise improves visual deficits tested by visual evoked potentials in streptozotocin-induced diabetic rats." Tohoku J Exp Med **213**(4): 313-21.
- Pate, R. R. y C. Macera (1994). Risk of exercising: Musculoskeletal damages. En Physical activity, fitness, and health: International proceedings and consensus statement. C. Bouchard, R. J. Shephard y T. Stephens (editores). Champaign, USA, Human Kinetics.
- Perez, A. C., A. C. Cabral de Oliveira, y cols. (2003). "Mitochondrial, sarcoplasmic membrane integrity and protein degradation in heart and skeletal muscle in exercised rats." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **134**(2): 199-206.

- Philpot, R. M. (1991). "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." Methods Enzymol **206**: 623-31.
- Pietraforte, D. y M. Minetti (1997). "Direct ESR detection of peroxynitrite-induced tyrosine-centred protein radicals in human blood plasma." Biochem J **325 ( Pt 3)**: 675-84.
- Pollock, M. L. (1973). "The quantification of endurance training programs." Exerc Sport Sci Rev **1**: 155-88.
- Postlethwait, E. M., S. D. Langford, y cols. (1995). "NO<sub>2</sub> reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." Free Radic Biol Med **19(5)**: 553-63.
- Powers, S. K., D. Criswell, y cols. (1993). "Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium." Am J Physiol **265(6 Pt 2)**: H2094-8.
- Powers, S. K., D. Criswell, y cols. (1994a). "Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle." Am J Physiol **266(2 Pt 2)**: R375-80.
- Powers, S. K., D. Criswell, y cols. (1994b). "Regional training-induced alterations in diaphragmatic oxidative and antioxidant enzymes." Respir Physiol **95(2)**: 227-37.
- Powers, S. K., K. C. DeRuisseau, y cols. (2004). "Dietary antioxidants and exercise." J Sports Sci **22(1)**: 81-94.
- Powers, S. K. y M. J. Jackson (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." Physiol Rev **88(4)**: 1243-76.
- Prendergast, F. G., R. P. Haugland, y cols. (1981). "1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers." Biochemistry **20(26)**: 7333-8.
- Quiles, J. L., J. R. Huertas, y cols. (1999). "Physical exercise affects the lipid profile of mitochondrial membranes in rats fed with virgin olive oil or sunflower oil." Br J Nutr **81(1)**: 21-4.
- Quintanilha, A. T., L. Packer, y cols. (1982). "Membrane effects of vitamin E deficiency: bioenergetic and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria." Ann N Y Acad Sci **393**: 32-47.
- Radak, Z., T. Kaneko, y cols. (2001). "Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain." Neurochem Int **38(1)**: 17-23.
- Radi, R., J. S. Beckman, y cols. (1991). "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." Arch Biochem Biophys **288(2)**: 481-7.
- Radi, R., S. Tan, y cols. (1992). "Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production." Biochim Biophys Acta **1122(2)**: 178-82.
- Refsgaard, H. H., L. Tsai, y cols. (2000). "Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products." Proc Natl Acad Sci U S A **97(2)**: 611-6.

- Reid, M. B., K. E. Haack, y cols. (1992a). "Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro." J Appl Physiol **73**(5): 1797-804.
- Reid, M. B., T. Shoji, y cols. (1992b). "Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals." J Appl Physiol **73**(5): 1805-9.
- Reid, M. B., F. A. Khawli, y cols. (1993). "Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle." J Appl Physiol **75**(3): 1081-7.
- Reid, M. B. (2001). "Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction." Med Sci Sports Exerc **33**(3): 371-6.
- Ren, S., X. He, y cols. (2010). "Effects of exercise on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity in brain aging mice." Weil Sheng Yan Jiu **39**(2): 239-41.
- Rice-Evans, C. y R. Burdon (1993). "Free radical-lipid interactions and their pathological consequences." Prog Lipid Res **32**(1): 71-110.
- Richter, C., J. W. Park, y cols. (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6465-7.
- Saengsirisuwan, V., F. R. Perez, y cols. (2002). "Effects of exercise training and antioxidant R-ALA on glucose transport in insulin-sensitive rat skeletal muscle." J Appl Physiol **92**(1): 50-8.
- Salminen, A. y V. Vihko (1983). "Endurance training reduces the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation in vitro." Acta Physiol Scand **117**(1): 109-13.
- Santin, K., R. F. da Rocha, y cols. (2011). "Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus." Brain Res **1421**: 1-10.
- Sastre, J., M. Asensi, y cols. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." Am J Physiol **263**(5 Pt 2): R992-5.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, y cols. (2000). "Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis." IUBMB Life **49**(5): 427-35.
- Saugstad, O. D. (1990). "Oxygen toxicity in the neonatal period." Acta Paediatr Scand **79**(10): 881-92.
- Schapira, A. H. y J. M. Cooper (1992). "Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing." Mutat Res **275**(3-6): 133-43.
- Schreck, R., K. Albermann, y cols. (1992). "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)." Free Radic Res Commun **17**(4): 221-37.
- Schroeder, F. (1984). "Role of membrane lipid asymmetry in aging." Neurobiol Aging **5**(4): 323-33.
- Selman, C., J. S. McLaren, y cols. (2002). "Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel

- running." Arch Biochem Biophys **401**(2): 255-61.
- Sen, C. K., E. Marin, y cols. (1992). "Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization." J Appl Physiol **73**(4): 1265-72.
- Sen, C. K., M. Atalay, y cols. (1994). "Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency." J Appl Physiol **77**(5): 2177-87.
- Sen, C. K. (1995). "Oxidants and antioxidants in exercise." J Appl Physiol **79**(3): 675-86.
- Sen, C. K. (2001). "Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction." Med Sci Sports Exerc **33**(3): 368-70.
- Sevanian, A. y E. Kim (1985). "Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes." J Free Radic Biol Med **1**(4): 263-71.
- Shinitzky, M. (1984). "Membrane fluidity in malignancy. Adversative and recuperative." Biochim Biophys Acta **738**(4): 251-61.
- Sies, H. y R. Mehlhorn (1986). "Mutagenicity of nitroxide-free radicals." Arch Biochem Biophys **251**(1): 393-6.
- Sik, R. H., C. S. Paschall, y cols. (1983). "The phototoxic effect of benoxaprofen and its analogs on human erythrocytes and rat peritoneal mast cells." Photochem Photobiol **38**(4): 411-5.
- Singer, S. J. y G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(4023): 720-31.
- Slater, S. J., M. B. Kelly, y cols. (1994). "The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure." J Biol Chem **269**(7): 4866-71.
- Sohal, R. S. y U. T. Brunk (1992). "Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence." Mutat Res **275**(3-6): 295-304.
- Somani, S. M., S. Frank, y cols. (1995a). "Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions." Pharmacol Biochem Behav **51**(4): 627-34.
- Somani, S. M., R. Ravi, y cols. (1995b). "Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat." Pharmacol Biochem Behav **50**(4): 635-9.
- Somani, S. M., K. Husain, y cols. (1996). "Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat." Alcohol **13**(6): 603-10.
- Somani, S. M., K. Husain, y cols. (1997). Response of antioxidant system to physical and chemical stress. Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals. S. I. Baskin y H. Salem. London, UK, Taylor & Francis: 125-141.
- Sparrow, C. P. y J. Olszewski (1993). "Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions." J Lipid Res **34**(7): 1219-28.
- Squadrito, G. L. y W. A. Pryor (1998). "Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide." Free Radic Biol Med **25**(4-5): 392-403.



- Stadtman, E. R., P. E. Starke-Reed, y cols. (1992). "Protein modification in aging." EXS **62**: 64-72.
- Stadtman, E. R. (1993). "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions." Annu Rev Biochem **62**: 797-821.
- Stadtman, E. R. (2001). "Protein oxidation in aging and age-related diseases." Ann N Y Acad Sci **928**: 22-38.
- St-Pierre, J., J. A. Buckingham, y cols. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." J Biol Chem **277**(47): 44784-90.
- Stubbs, C. D. y A. D. Smith (1984). "The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function." Biochim Biophys Acta **779**(1): 89-137.
- Subramaniam, R., F. Roediger, y cols. (1997). "The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins." J Neurochem **69**(3): 1161-9.
- Sun, L., W. Shen, y cols. (2010). "Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients." Life Sci **86**(1-2): 39-44.
- Sunshine, C. y M. G. McNamee (1994). "Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity." Biochim Biophys Acta **1191**(1): 59-64.
- Supinski, G. S. y L. A. Callahan (2007). "Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions." J Appl Physiol **102**(5): 2056-63.
- Szabo, Z., Z. Ying, y cols. (2010). "Voluntary exercise may engage proteasome function to benefit the brain after trauma." Brain Res **1341**: 25-31.
- Teleglow, A., Z. Dabrowski, y cols. (2011). "Effects of cold water swimming on blood rheological properties and composition of fatty acids in erythrocyte membranes of untrained older rats." Folia Biol (Krakow) **59**(3-4): 203-9.
- Teodoro, B. G., A. J. Natali, y cols. (2012). "Improvements of Atherosclerosis and Hepatic Oxidative Stress are Independent of Exercise Intensity in LDLr(-/-) Mice." J Atheroscler Thromb **19**(10): 904-11.
- Tian, Y., J. Nie, y cols. (2010). "Serum oxidant and antioxidant status during early and late recovery periods following an all-out 21-km run in trained adolescent runners." Eur J Appl Physiol **110**(5): 971-6.
- Tidball, J. G., E. Lavergne, y cols. (1998). "Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): C260-6.
- Toldy, A., K. Stadler, y cols. (2005). "The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain." Brain Res Bull **65**(6): 487-93.
- Tomita-Yamaguchi, M., C. Rubio, y cols. (1991). "Regional influences on the physical

- properties of T cell membranes." Life Sci **48**(5): 433-8.
- Tuon, T., S. S. Valvassori, y cols. (2010). "Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice." Neurosci Lett **475**(1): 16-9.
- Turgut, G., S. Demir, y cols. (2003). "The effect of swimming exercise on lipid peroxidation in the rat brain, liver and heart." Acta Physiol Pharmacol Bulg **27**(2-3): 43-5.
- Urso, M. L. y P. M. Clarkson (2003). "Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation." Toxicology **189**(1-2): 41-54.
- Valko, M., H. Morris, y cols. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem **12**(10): 1161-208.
- Vasankari, T. J., U. M. Kujala, y cols. (1997). "Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidant defences." Free Radic Biol Med **22**(3): 509-13.
- Viani, P., G. Cervato, y cols. (1991). "Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties." J Neurochem **56**(1): 253-8.
- Vitiello, D., J. Boissiere, y cols. (2011). "beta-Adrenergic receptors desensitization is not involved in exercise-induced cardiac fatigue: NADPH oxidase-induced oxidative stress as a new trigger." J Appl Physiol **111**(5): 1242-8.
- Vlasic, N., M. S. Medow, y cols. (1993). "Lipid fluidity modulates platelet aggregation and agglutination in vitro." Life Sci **53**(13): 1053-60.
- Voet, D., J. G. Voet, y cols. (2007). Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular. Madrid, Editorial Médica Panamericana.
- Wilmore, J. H. y D. L. Costill (2004). Physiology of Sport and Exercise. Champaign, USA, Human Kinetics.
- Wisloff, U., J. Helgerud, y cols. (2001). "Intensity-controlled treadmill running in rats: VO<sub>2</sub> max) and cardiac hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H1301-10.
- Witt, E. H., A. Z. Reznick, y cols. (1992). "Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation." J Nutr **122**(3 Suppl): 766-73.
- Wonders, K. Y., D. S. Hydock, y cols. (2007). "Time-course of changes in cardiac function during recovery after acute exercise." Appl Physiol Nutr Metab **32**(6): 1164-9.
- Xia, R., J. A. Webb, y cols. (2003). "Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide." Am J Physiol Cell Physiol **285**(1): C215-21.
- Yamamoto, M. y H. Kanehisa (1995). "Dynamics of anaerobic and aerobic energy supplies during sustained high intensity exercise on cycle ergometer." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **71**(4): 320-5.
- Yang, R. C., G. W. Mack, y cols. (1998). "Albumin synthesis after intense intermittent exercise in human subjects." J Appl Physiol **84**(2): 584-92.

- You, T., A. H. Goldfarb, y cols. (2005). "Oxidative stress response in normal and antioxidant supplemented rats to a downhill run: changes in blood and skeletal muscles." Can J Appl Physiol **30**(6): 677-89.
- Yu, B. P., E. A. Suescun, y cols. (1992). "Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction." Mech Ageing Dev **65**(1): 17-33.
- Yu, B. P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." Physiol Rev **74**(1): 139-62.
- Yui, Y., R. Hattori, y cols. (1991). "Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils." J Biol Chem **266**(6): 3369-71.
- Zarkovic, K. (2003). "4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases." Mol Aspects Med **24**(4-5): 293-303.
- Zerba, E., T. E. Komorowski, y cols. (1990). "Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice." Am J Physiol **258**(3 Pt 1): C429-35.
- Zigler, J. S., Jr. y J. D. Goosey (1981). "Photosensitized oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens." Photochem Photobiol **33**(6): 869-74.
- Zimmer, G., T. Thurich, y cols. (1993). Membrane fluidity and vitamin E. En Vitamin E in Health and Disease. L. Packer y J. Fuchs (editores). New York, USA, Marcel Dekker, Inc.: 207-222.
- Zuo, L., F. L. Christofi, y cols. (2004). "Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle." J Appl Physiol **97**(2): 661-8.