



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGIA HUMANA

TESIS DOCTORAL

***VALORACIÓN BIOLÓGICA DE LA RESPUESTA
ANTIOXIDANTE DEL EJERCICIO FÍSICO EN RATAS
EMOCIONALMENTE ESTRESADAS***

IGNACIO ROSETY RODRIGUEZ

2009

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 ESTRÉS OXIDATIVO: CONCEPTO Y FISIOPATOLOGÍA

Podemos definir el estrés oxidativo como el daño infringido por la superproducción de especies oxigenadas reactiva cuando se produce un desequilibrio entre estas y los mecanismos de defensa antioxidante o los mecanismo reparadores (Sies, 1993), conduciendo a la lipoperoxidación, desnaturalización proteica o enzimática o daño mutagénico de los ácidos nucleicos. Según la continuidad de la generación de los radicales libres, el estrés oxidativo se puede producir de forma aguda o crónica. Entre los primeros podemos citar la repercusión tras isquemia, la inflamación aguda y la hiperoxia. Una importante causa de estrés crónico es la respuesta inflamatoria (Ceruti y Trump, 1991), ya que los leucocitos activados representan una importante fuente de ROS in situ (Weiss, 1989). Estas especies oxigenadas no solo median la muerte de las células blanco, sino que también inducen a estrés oxidativo en los tejidos adyacente. Esta injuria resultante de la inflamación crónica asociada a carcinogénesis se observan en la colitis ulcerosa (Collins et al., 1987), el mesotelioma inducido por hepatitis crónica (Arthur et al., 1984)

Tanto la luz ultravioleta como las radiaciones ionizantes de alta energía estimulan la mutagénesis por la generación de especies oxigenadas reactivas in situ.

Existen evidencias que sugieren que las ROS liberadas en la lipoperoxidación son responsables de la asociación entre la ingesta de grasas

saturadas y cancer colorectal (Salim, 1993). En estos procesos el hierro es un cofactor importante que aumenta la producción de ROS en el colon (Babbs, 1990). El cobre que es un catalizador tan efectivo como el hierro en la reacción de Fenton, es un mutágeno más potente que éste *in vitro* (Tkeshelashvili et al., 1991), lo cual se explica por interacciones directas del cobre con las bases del ADN (Guyton y Kensler, 1993).

El etanol es otro factor de riesgo para el desarrollo del cáncer, probablemente actuando por la generación de radicales libres durante su metabolismo, ya que su efecto carcinogénico está directamente relacionado con la lipoperoxidación (Mufti, 1992)

1.1.1.- Oxidación de las proteínas

Consecuencia de su compleja estructura y a los grupos funcionales oxidables de los aminoácidos, las proteínas son un blanco fácil para los oxidantes. Durante la oxidación proteica se produce una amplia variedad de modificaciones químicas de las proteínas. Estas modificaciones debida a la oxidación directa de un aminoácido específico o por escisión de la proteína pueden producir un daño en la actividad biológica y cambios en las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas.

El constante flujo de ROS en las célula vivas puede causar daño a la cadena acil de las membranas, a los grupos polares de la fosfatidiletanolamina y fosofatidilserina, al ADN y las proteínas. La oxidación de las proteínas pueden conducir a la formación de puentes reversibles disulfitos, o a derivados que no son biológicamente reducibles como por ejemplo la base de schiff (Esterbauer et al., 1991). Las proteínas pueden ser atacadas por ROS originadas en la membrana o en

la fase acuosa tales como el óxido nítrico, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno.

La modificación oxidativa de las proteínas tiene lugar mediante dos mecanismos diferentes.

A.- Formación de ROS en el sitio específico vía activación redox de metales de transición a los cuales no están fuertemente ligados a la proteína. Este daño es catalizado por iones metálicos, dando lugar a la formación de derivados carbonilos (Stadtman et al., 1993).

B.- ROS no dependiente de metales producen oxidación de aminoácidos. En estos procesos hay daño directo a los aminoácidos o degradación oxidativa de las proteínas por escisión del enlace péptido (Stadtman et al., 1993).

1.1.2. Peroxidación lipídica

Dado que los lípidos son los principales constituyentes de las membranas celulares, el ataque de un radical libre a un ácido graso poliinsaturado, proceso que se denomina peroxidación lipídica, es de gran interés. Los lípidos son fácilmente oxidados, y la reacción se propaga en cadena una vez iniciada (Porter et al., 1995). Así, al menos teóricamente, la oxidación de una molécula lipídica podría llevar a la destrucción de todas los lípidos del organismo. Hay diferentes antioxidantes naturales y sintéticos capaces de reducir efectivamente la peroxidación lipídica, siendo el más conocido y eficaz el beta-caroteno (vitamina E), molécula identificada como uno de los principales antioxidantes de la naturaleza y que elimina rápidamente los radicales peroxilo (Packer, 1994). El radical peroxilo se forma por peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en membranas celulares ricas en lípidos.

1.1.3. Proceso general de peroxidación lipídica

El proceso implica la eliminación de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado por parte de un radical libre. Este paso de iniciación produce un radical ácido graso, que finalmente se convertirá en radical peroxilo. El radical peroxilo interacciona con un ácido graso polinsaturado y propaga la peroxidación lipídica (iniciación secundaria). Si no se interrumpe, esta reacción en cadena puede llevar a un daño extensivo en los lípidos de esa membrana.

Pieri y cols (1994), utilizando un modelo *in vitro*, encontraron que la melatonina no sólo era mejor neutralizador de radicales peroxilo que el glutatión y el ácido ascórbico (vitamina C), sino que era dos veces más eficaz que la vitamina E. Así, establecieron que la capacidad de estos compuestos para eliminar radicales peroxilo era: melatonina mayor que trólox (vitamina E hidrosoluble) mayor que ácido ascórbico, mayor que GSH. Otros estudios, sin embargo, muestran una capacidad de la melatonina como antioxidante lipídico igual (Scaiano, 1995) o incluso menor (Marshall et al., 1996) que la mostrada por la vitamina E.

Según distintos estudios, el ejercicio físico puede producir estrés oxidativo y acelerar la lipoperoxidación en humanos (Davies et al., 1982; Inayama et al., 1996; Leeuwenburgh y Ji, 1996). Prácticamente todos estos estudios implican ejercicio aeróbico que produce un incremento de especies de oxígeno activas que aplastan las defensas antioxidantes hasta el punto en que los radicales libres y las reacciones de lipoperoxidación se desatan.

La lipoperoxidación no se produce por la consumición de altos niveles de oxígeno sino más bien por altos niveles de epinefrina circulante. El ejercicio regular tiende a disminuir los niveles de epinefrina circulante (Geenen et al., 1988). Niveles altos de

epinefrina pueden contribuir a la lipoperoxidación y a enfermedades cardiovasculares y diabetes.

1.1.4.- Daño Oxidativo: Toxicidad de los radicales libres

Cuando los sistemas fisiológicos (enzimas específicas y neutralizadores biológicos) están saturados debido a la excesiva producción de radicales libres (exposición a radiación ionizante, radiación UV intensa, ciertas drogas, ...) o debido a una actividad enzimática disminuida (sistemas enzimáticos deficientes en recién nacidos, problemas asociados al envejecimiento, ...), la neutralización de los radicales implica a otros sistemas celulares tales como membranas, ácidos nucleicos y proteínas. La propagación de radicales a constituyentes celulares causa un deterioro considerable de las membranas y del metabolismo, llevando en último término a la muerte celular.

El daño oxidativo a moléculas biológicas está asociado con la interacción del oxígeno y el peróxido de hidrógeno con metales de transición, generalmente hierro, cobre, o ambos. La generación de especies reactivas se produce por una reacción de Fenton cuando el ion ferroso actúa como catalizador (Halliwell y Gutteridge, 1990, 1992). Incluso en presencia de pequeñas cantidades de hierro, se puede producir un gran daño oxidativo debido a la potente acción catalítica de este ión. La especificidad de sitio que caracteriza al daño oxidativo de ácidos nucleicos y proteínas es una consecuencia de las propiedades de unir hierro de estas moléculas. Así, el daño a aminoácidos específicos en las proteínas es debido a su proximidad al sitio de unión del hierro o al sitio activo de una enzima, el cual contiene hierro o cobre.

Algunos de los procesos que se han asociado con la producción de radicales libres son: envejecimiento, carcinogénesis, aterosclerosis, diversas patologías cerebrales (trauma cerebral, isquemia) y procesos neurodegenerativos (demencia senil tipo

Alzheimer, enfermedad de Parkinson), patologías pulmonares, daño retinal degenerativo, daño renal y daño muscular (Cheeseman y Slater, 1993).

1.1.5.- Estatus antioxidante

El status antioxidante se define como el balance entre prooxidantes y antioxidantes (Papas, 1996). Este balance es dinámico y está ligeramente inclinado a favor de la oxigenación (Halliwell et al., 1995). El organismo se ha adaptado a este ligero desbalance con el desarrollo de mecanismos reparadores como ligasas, nucleasas, polimerasas, proteinasas ó fosfolipasas. Además un modesto y gradual aumento en la oxidación induce la producción de antioxidante endógenos, surgiendo así un mecanismo de regulación tipo feed-back (Frank et al., 1989).

El conocimiento de los factores que afectan al status antioxidante permite el desarrollo de hábitos para la prevención del estrés oxidativo, y por tanto de la enfermedad. Estos factores pueden ser agrupados de la siguiente forma: dieta y alcohol, medio ambiente, injuria y enfermedad, estado fisiopatológico, ejercicio, envejecimiento y otros (Papas, 1996).

1.2.- ANTIOXIDANTES

Podemos definir antioxidante como "cualquier sustancia que cuando se halla en concentraciones pequeñas en relación con la concentración del sustrato oxidable, evita o retarda su oxidación significativamente" (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Una primera línea de defensa contra las especies oxigenadas reactivas es prevenir su formación (Sies, 1993). Así, la prevención de la iniciación de las reacciones en cadena incluye ligar iones metálicos, principalmente hierro y cobre. De esta forma las proteínas que ligan estos, como la ferritina, transferrina y ceruloplasmina son de vital importancia para controlar las reacciones generadoras de radicales (Sies, 1993). Otra estrategia para aumentar

la resistencia a la oxidación dependiente de iones metálicos es modificar sus blancos de acción, como es el caso de la modificación de las LDL por el dehidroascorbato (Retsky et al, 1993).

1.2.1.- Defensa frente a los radicales libres

La formación de radicales de oxígeno potencialmente tóxicos es inherente al funcionamiento de los organismos y constituye la paradoja del oxígeno. Este es el motivo de que sea necesario controlar la formación de radicales libres. Los organismos presentan sistemas de defensa antioxidante (Tabla 2), cuya finalidad es proteger a las moléculas del daño producido por los radicales de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Tabla 2.- Mecanismo de defensa antioxidante

Enzimáticos	Superóxido dismutasa Catalasa Glutation peroxidasa Glutation reductasa Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa OxidoNítrico Sintasa	
No Enzimáticos	Secuestradores de iones metálicos Neutralizadores de radicales libres	Ferritina transferrina lactoferrina ceruloplasmina albúmina Alfa-tocoferol beta-tocoferol manitol ácidoúrico ácido ascórbico

El primero de estos sistemas de protección se basa en un sistema enzimático de defensa específico y variado, presente en el sitio de producción de los radicales, que los mantiene a bajas concentraciones. Este grupo de enzimas incluye dos formas de la superóxido dismutasa (SOD), una dependiente de Cobre y Zinc y la otra dependiente de Magnesio, la catalasa (CAT), la glutacion peroxidasa (GPx), la glutacion reductasa (GR) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Estas enzimas previenen el daño oxidativo

metabolizando los radicales libres tóxicos producidos como consecuencia del metabolismo respiratorio normal o durante el estrés oxidativo.

1.2.2.- Relación entre Ejercicio Físico y Antioxidante

Sin embargo, los organismos aeróbicos deben pagar un alto precio por la enorme ventaja evolutiva que supone el metabolismo aeróbico, que permite maximizar la energía obtenida por unidad de sustrato así como evitar la acumulación de lactato, a la postre, uno de los elementos claves en la fatiga muscular.

Durante el metabolismo oxidativo, la mayor parte del oxígeno se une al hidrógeno durante la fosforilación oxidativa, formando agua. Sin embargo, se estima que un 4-5% del oxígeno consumido durante la respiración celular no se reduce completamente hasta formar una molécula de agua sino que generará radicales libres.

El incremento de las demandas energéticas durante la práctica de ejercicio físico, especialmente de tipo aeróbico, obliga a incrementar el aporte de oxígeno a los tejidos activos. Así mientras el incremento en líneas generales es de 10-15 veces el del estado de reposo, a nivel muscular, el incremento puede llegar hasta las 100 veces sus valores basales. A su vez, esto se asocia con un aumento de 30 veces su flujo sanguíneo habitual y de 3 veces la diferencia arterio-venosa de oxígeno.

El ejercicio muscular induce a un aumento de la producción de radicales libres y otras formas de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Davies et al., 1982; O'Neill et al., 1996; Reid et al., 1992; Borzone et al., 1994). Además, existen evidencias que implican la citotoxicidad de las ROS como una etiología esencial en las perturbaciones producidas en el

músculo por el ejercicio, las cuales podrían producir fatiga y/o lesión muscular (Jil et al., 1988; Barclay y Hansel, 1991; Reid et al., 1992; Nashawati et al., 1993).

Dado el papel potencial de las ROS en contribuir en la perturbación del estatus redox del músculo, no sorprende que los miocitos contengan mecanismos de defensa para reducir el riesgo de lesión oxidativa. Dos clases principales de mecanismos endógenos protectivos (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) actúan juntos para disminuir los efectos dañinos de los oxidantes en la célula.

1.2.3.- Superóxido dismutasa (SOD)

Es el principal mecanismo de defensa para combatir la toxicidad del oxígeno. Fue descrita por primera vez por McCord et al. en 1969.

En el músculo esquelético de los humanos y otros mamíferos existen dos isoenzimas de la superóxido dismutasa, la CuZn superóxido dismutasa se localiza principalmente en el citosol mientras que la Mn superóxido dismutasa se localiza en la matriz mitocondrial. Ambas enzimas catalizan la dismutación del anión superóxido con similar eficiencia (Ohno et al., 1994).

La distribución de las isoformas de la superóxido dismutasa varía de unos tejidos a otros. En el músculo esquelético, del 15 al 35% de la actividad total de la superóxido dismutasa se encuentra en la mitocondria y del 65 al 85% en el citosol (Ji et al., 1988). La actividad de la superóxido dismutasa es más alta en los músculos con alta capacidad oxidativa (Criswell et al., 1993; Powers et al., 1994).

1.2.4.- Glutation peroxidasa (GPx)

La glutación peroxidasa cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno o hidroperoxidos orgánicos en agua y alcohol respectivamente usando glutantion reducido como donador de electrones (Halliwell y Gutteridge, 1986).

La glutation peroxidasa es una enzima dependiente de Se y su actividad varía según el tipo de fibra muscular (Ji et al., 1988; Powers et al., 1994). Igual que la superóxido dismutasa se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria. En el músculo esquelético, aproximadamente el 45% de la actividad se encuentra en el citosol y el 55% en la mitocondria (Ji et al., 1988). Las células regeneran la GSH mediante la glutación reductasa usando NADPH.

En la mayoría de los tejidos el NADPH es producido por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa vía de las pentosas (Mathews y Holde, 1990). Sin embargo, en el músculo esquelético el NADPH es producido principalmente por la isocitrato deshidrogenasa (Pfeifer et al., 1986; Lawler et al., 1993).

1.2.5.- Glutation reductasa (GR)

La glutation reductasa tiene la misma distribución celular que la glutation peroxidasa y su actividad es mayor en músculo con alta capacidad oxidativa. Aunque no se considera como una de las enzimas antioxidante principales, es esencial para el normal funcionamiento antioxidante de la glutation peroxidasa.

1.2.6.- Catalasa (CAT)

Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno. Requiere Fe^{3+} como cofactor el cual debe estar unido en el sitio activo de la enzima (Halliwell y Gutteridge, 1986).

Aunque la función de la catalasa viene a coincidir en parte con la glutatión peroxidasa se diferencian por su afinidad por el peróxido de hidrógeno como sustrato. En comparación con la catalasa, la glutatión peroxidasa a bajas concentraciones tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno. Esto quiere decir que a bajas concentraciones, la glutatión peroxidasa juega un papel más activo en eliminar el peróxido de hidrógeno en la célula muscular. La catalasa está ampliamente distribuida en las células, dándose la mayor concentración en peroxisomas y mitocondria (Halliwell y Gutteridge, 1989). Igual que la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, la actividad de la catalasa es más alta en músculos con alta capacidad oxidativa (Powers et al., 1994)

1.2.7.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)

La oxidación directa de la glucosa-6-fosfato por esta enzima fue demostrada por primera vez en 1936 (Dickens y Glock, 1936), aunque la enzima no fue purificada hasta 20 años más tarde (Marks et al., 1961). La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa está ampliamente distribuida en las células de mamíferos y juega un papel muy importante en los mecanismos de defensa antioxidante (Reiter et al., 1994).

1.2.8.- Vitamina E

Constituye la más importante defensa antioxidante de los fluidos extracelulares y de las membranas biológicas (Burton e Ingold, 1989; Burton y Traber, 1990). El término genérico de vitamina E se refiere a ocho isómeros de tocoferol y tocotrienol. Entre ellos, el alfa-tocoferol es el mejor conocido y posee la más potente actividad antioxidante (Burton y Traber, 1990; Janero, 1991).

La vitamina E tiene una alta solubilidad lipídica y la concentración en los tejidos y órganos es relativamente baja, aunque pueda ser aumentada con suplementación en la dieta. (Janero, 1991).

Como antioxidante, es particularmente importante por su habilidad de convertir los radicales superóxidos, hidroxílicos, peróxido lipídicos en formas menos reactivas. La vitamina E puede también romper la reacción en cadena de la lipoperoxidación que tiene lugar durante el daño de los radicales libres en las membranas, actuando transfiriendo un átomo de hidrógeno al radical peróxido, que es formado durante la reacción en cadena, pasando él a poseer un electrón desapareado (Burton e Ingold, 1989).

Aunque la vitamina E es un eficiente neutralizador de radicales su interacción con un radical produce una reducción funcional de la vitamina E y la formación de vitamina E radical. Se ha demostrado que el estrés oxidativo reduce significativamente los niveles de vitamina E en los tejidos (Packer et al., 1979; Burton y Traber, 1990; Janero, 1991) Sin embargo este puede ser reciclado a su estado nativo por otros antioxidantes (Packer et al., 1979; Burton y Traber, 1990)

1.2.9.- Vitamina C

La vitamina C (ácido ascórbico) es hidrofílica y funciona mejor en medios acuosos que la vitamina E. Debido a su pKa 4.25, el anión ascorbato es la forma predominante a pH fisiológico (Yu, 1994a). El ascorbato está ampliamente distribuido en los tejidos de mamíferos, pero los contenidos son relativamente altos en las glándulas adrenal y pituitaria (Yu, 1994a).

Las propiedades de la vitamina C como antioxidante es doble. Primero, puede neutralizar los ROS (Halliwell y Gutteridge, 1990). Segundo, la vitamina C juega un papel importante en el reciclado de la vitamina E (Packer et al., 1979). Sin embargo, vitamina C es consumida y se produce vitamina C radical (Packer et al., 1979). Este radical puede ser reducido a su estado nativo de vitamina C por la NADH semiascorbil reductasa, o por el glutatión y ácido dihidrolipoico (Sevanian et al., 1985).

El aumento celular de vitamina C debe proteger contra el daño producido por los radicales (Yu, 1994a). Si embargo, la vitamina C en altas concentraciones y en presencia de Fe^{3+} o Cu^{2+} actúa como un potente prooxidante (Halliwell y Gutteridge, 1986), estimulando la lipoperoxidación y la formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno (Walling, 1982), por ello una sobre suplementación ha sido cuestionado por algunos investigadores (Yu, 1994a).

2.- ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Desde la antigüedad se conoce, que el estrés psíquico provocaba en los gladiadores, deportistas y otros sujetos sometidos a ejercicios físicos, un cierto fracaso en sus actuaciones.

Recientes estudios indican que el ejercicio de fuerza, consigue reducir el daño oxidativo. Este hecho se explicaría al menos en parte, por un aumento de las defensas antioxidantes de tipo enzimático (Chang et al. 2004; Ordonez et al. 2006; Ordonez et al. 2007; Oztasan et al. 2004). Por el contrario, actividades a máxima intensidad o extenuantes si se han correlacionado con un aumento de la actividad pro-oxidante (Ogonovszky et al. 2005; Palazzetti et al. 2003).

Mención especial merecen los casos de sobreentrenamiento en los que parece más evidente el papel de éste (Guezennec 2004).

Pero la actuación del medico del deporte no solo se limitaría al alto rendimiento sino que también podría llegar a tener su utilidad práctica en el resto de la población general de las sociedades occidentales con vistas a amortiguar los efectos del estrés en diversos procesos cardiovasculares (Lundberg 2003). E incluso en la plasticidad neuronal y morfología de las dendritas en un contexto de neurotoxicidad tal y como sugieren los resultados publicados por Zaidi y Banu (2004).

En situaciones de estrés psíquico mantenido se producen una serie de adaptaciones fisiológicas que incluyen tanto al sistema nervioso central como al

endocrino. De hecho, se produce una liberación del factor liberador de la corticotropina (CRF) desde el núcleo paraventricular hipotalámico que a su vez estimula la producción de la hormona adenocorticotropa (ACTH) a nivel hipofisario anterior que será quien finalmente aumente la secreción de corticosterona en la glándula suprarrenal.

En este mismo sentido hoy se acepta el importante papel que hormonas del estrés como el cortisol, tendrían entre sus múltiples manifestaciones (Hoffman y Al`Absi 2004). De hecho, el descenso de la ratio testosterona/cortisol es una herramienta enormemente valiosa a la hora de establecer el diagnóstico del síndrome de sobreentrenamiento (Urhausen y Kindermann 2002).

Asimismo, García y Armario (2001) ya avanzaron que la acción de este tipo de estresantes psíquicos podría objetivarse por la elevación de los niveles plasmáticos de la hormona adenocorticotropina (ACTH). E incluso autores como Hand et al. (2002) proponen como estrategia la determinación de la CRH (factor liberador de la corticotropina).

Recientes estudios realizados en pequeños animales de experimentación parecen sugerir que el estrés psíquico o emocional se asocia a un desequilibrio entre las fuerzas pro y antioxidantes del metabolismo redox lo que finalmente podría desembocar en un claro daño oxidativo, mayoritariamente en forma de peroxidación lipídica y oxidación proteica (Fontella et al. 2005; Sahin y Gumuslu 2004a; Sahin et al. 2004b; Tandon et al. 2004; Zaidi y Benu, 2004).

Para inducir tal situación de estrés, existen múltiples procedimientos diseñados para ser aplicados a los animales de laboratorio como la inmovilización, la suspensión en el aire, el ayuno, choques eléctricos, choques térmicos (frio y/o calor), etc. En este mismo sentido, recientes trabajos sugieren que la inmovilización es menos agresiva para el animal que la inmersión o la suspensión o la aplicación de

descargas eléctricas (Retana-Márquez et al. 2003). Asimismo merece ser destacado que la inmovilización en este tipo de animales genera mayores niveles de hormonas del estrés que la realización de una prueba física en un tapiz rodante, lo que nos sugiere que el estrés psíquico es significativamente mayor que el físico tomando como referencia los niveles plasmáticos de cortisol.

En cualquier caso, estos protocolos de inmovilización están perfectamente descritos en la literatura ya que han sido ampliamente utilizados en estudios conductuales y de comportamiento de animales de experimentación (Abidin et al. 2004).

Sin embargo, hasta la fecha se le ha prestado escasa atención al posible papel del estrés psíquico inducido por inmovilización en la valoración del daño oxidativo. Por lo que, de ser favorables los resultados, contribuiríamos en la estandarización y recomendación de este tipo de procedimientos para aplicarlos en esta línea de trabajo.

Y es que en los últimos años ha ido creciendo el interés por el estrés oxidativo en el campo de la medicina del deporte por dos razones fundamentalmente.

Por un lado, por su posible influencia en el rendimiento deportivo de los atletas. En este sentido, el estrés oxidativo podría ser uno de los factores que conducen a la fatiga muscular tal y como expresaron en un clásico estudio Barclay y Hansel (1991).

Por otro, aunque no menos importante, por la repercusión que el deporte de competición con sus enormes exigencias físicas podría tener en la salud del deportista a medio-largo plazo (Packer 1997). Y no solo a estos sino también a los

deportistas recreacionales que puntualmente se someten a ejercicios extenuantes (Clarkson 1995).

Por consiguiente nos encontramos ante dos temas que en la actualidad acaparan multitud de originales y revisiones en las bases de datos, especialmente este último. De hecho se estima que cada seis años se duplican los títulos publicados relativos al estrés oxidativo en la literatura especializada, observándose que además del músculo, el hígado cobra cada vez mayor importancia como órgano diana.

De hecho, el hígado es un órgano clave en numerosos procesos metabólicos y detoxificadores lo que conlleva su exposición a gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) tanto endógenas, por la cadena respiratoria (Inoue et al. 2003), como exógenas, por la enorme vascularización que soporta (Poli 2000). De hecho, éste ha sido objeto de estudio en frecuentes ocasiones a la hora de valorar el estrés oxidativo tanto en su vertiente pro-oxidante (Venditti et al. 2004) como en la antioxidante (Zaidi et al. 2005).

Y es que el estrés oxidativo es un evento fisiopatológico común a diversos procesos patológicos que asientan en este órgano y que van desde trastornos metabólicos hasta los proliferativos, pasando por la isquemia/repercusión propia de los trasplantes hepáticos. Por ello profundizar en su estudio podría ser de enorme interés con vistas a la identificación de biomarcadores del daño oxidativo. Máxime cuando éstos permitirían una detección precoz del proceso, la monitorización del mismo e incluso su respuesta frente a sus correspondientes estrategias terapéuticas. (Cesaratto et al. 2004).

Para que el daño oxidativo celular sea una realidad necesitamos que aumente la producción de radicales libres o bien que disminuya la actividad de los antioxidantes (Nakazawa et al. 1996).

Y es que, aunque el anión superóxido no es especialmente citotóxico, si puede dar lugar a radicales de mayor actividad como los radicales hidroxilos (Rosser y Gores 1995) que atacarían con mayor avidez a las biomacromoléculas como lípidos, proteínas e incluso el propio material genético (Berlett et al. 1997).

Los investigadores podemos objetivar indirectamente dicho daño oxidativo en un individuo establecido mediante la determinación de la peroxidación lipídica, de la oxidación de proteínas y del material genético (DNA).

Pero también existe un mecanismo indirecto que daña a las células mediante la activación de factores de transcripción que conducen a la síntesis de citokinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (Rosser y Gores 1995).

Las membranas biológicas son sitios de enorme trascendencia para nuestra homeostasis al ser donde asientan enzimas, receptores de hormonas, transportadores de iones y metabolitos, etc. El principal componente de las mismas son los fosfolípidos que contienen los ácidos grasos poliinsaturados, conocidos por su acrónimo inglés PUFA. Éstos a su vez presentan grupos metileno ($-CH_2$) que son altamente vulnerables al ataque de los radicales libres (Stubbs y Smith 1984).

El proceso de peroxidación lipídica se inicia cuando los radicales libres atacan al átomo de hidrógeno de un grupo metileno ($-CH_2$) de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas celulares. E incluso va más allá ya que los radicales peroxilos que se forman serán capaces de propagar el daño oxidativo al ser productos altamente inestables.

Todo ello implicaría no solo una alteración de su funcionalidad sino también de la permeabilidad de la membrana con la consiguiente pérdida de su capacidad de barrera y de su fluidez. Asimismo la alteración de las membranas celulares afectará a diversas funciones celulares como el metabolismo del ácido araquidónico (leucotrienos y prostaglandinas), metabolismo del calcio, regulación de la acción de hormonas liposolubles, entre otras (Selvam 2002).

Habida cuenta que los productos derivados de la peroxidación van a depender no solo de la composición química del tejido sino también de la presencia o ausencia de iones metálicos, no se acepta en la actualidad ningún biomarcador como estándar o referencia a la hora de estudiar el daño oxidativo de un determinado individuo (Halliwell y Chirico,1993).

Una de las técnicas más empleadas en los últimos años es precisamente la determinación de subproductos de la peroxidación lipídica en la que los TBARS (sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico) ha tenido una buena acogida entre los grupos de investigación (Janero 1990).

En todo caso, la valoración del daño oxidativo a través de la peroxidación lipídica necesita ser complementada con el estudio de otras variables también indirectas como por ejemplo la oxidación de proteínas. Esta se define como una modificación covalente de una proteína inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS), que afectan fundamentalmente a ciertos aminoácidos (histidina, arginina, lisina, y prolina) y que se puede objetivar mediante la determinación de grupos carbonilos.

En otro orden de cosas convendría matizar que el objetivo fundamental en este campo deberá entrarse en mantener intacto el equilibrio redox para evitar el

daño oxidativo, pero no en acabar por completo con la producción de especies reactivas de oxígeno. Y es que éstas pueden formar parte de procesos celulares fundamentales para nuestra salud y bienestar. Así, desempeñan un rol esencial en la fagocitosis y posterior destrucción de microorganismos (Lilius y Marnila 1992). También son capaces de regular la expresión de genes como c-myc, c-fos ó b-actin que a la sazón participarán en el crecimiento, diferenciación y desarrollo de algunas líneas celulares (Amstad et al. 1992). E incluso podrían participar en la fisiología de la vasoregulación (Okatani et al. 1998).

Al hacer una revisión de la literatura se desprende que la ingesta de antioxidantes, fundamentalmente vitaminas (E y C) podrían reducir el daño oxidativo. Y más recientemente que el ejercicio físico regular a intensidad ligera-moderada también podría hacerlo. Y por el contrario, desde principio de los 80 ya sabemos por pruebas realizadas con resonancia electrónica en homogeneizados musculares que la actividad física extenuante incrementa la producción de radicales libres en ratas (Davies et al. 1982).

Durante el metabolismo oxidativo, la mayor parte del oxígeno se une al hidrógeno durante la fosforilación oxidativa, formando agua. Sin embargo, se estima que un 4-5% del oxígeno consumido durante la respiración celular no se reduce completamente hasta formar una molécula de agua sino que generará radicales libres.

Como vemos, los organismos aeróbicos deben pagar un alto precio por la enorme ventaja evolutiva que supone el metabolismo aeróbico, que permite maximizar la energía obtenida por unidad de sustrato así como evitar la acumulación de lactato, a la postre, uno de los elementos claves en la fatiga muscular.

El incremento de las demandas energéticas durante la práctica de ejercicio físico, especialmente de tipo máximo o extenuante, obliga a incrementar el aporte de oxígeno a los tejidos activos (Asha Devi, 2002). Así mientras el incremento en líneas generales es de 10-15 veces el del estado de reposo, a nivel muscular, el incremento puede llegar hasta 100 veces sus valores basales. A su vez, esto se asocia con un aumento de 30 veces su flujo sanguíneo habitual y de 3 veces la diferencia arterio-venosa de oxígeno.

Al hacer una revisión de la literatura especializada, destacando los originales publicados por Alessio (1993), Packer (1997), Sen (1995) se desprende que este tipo de ejercicio generaría radicales libres por cuatro mecanismos posibles, a saber:

- a. incremento de la liberación de adrenalina y otras catecolaminas que a su vez producirán especies reactivas de oxígeno
- b. producción de ácido láctico que podría transformar radicales relativamente débiles desde un punto de vista del daño oxidativo, como los superóxidos, en otros significativamente más agresivos como los radicales hidroxilos
- c. por la respuesta inflamatoria secundaria al daño muscular ocasionado por el sobre uso
- d. por la reperfusión de los órganos nobles tras un ejercicio intenso en el que la sangre estaba mayoritariamente a nivel periférico, esto es, a nivel muscular. Y es que la producción de especies reactivas de oxígeno se incrementa dramáticamente durante la reperfusión porque los electrones liberados de la cadena respiratoria pueden ser donados directamente al oxígeno recién llegado.

En todo esto también parece influir decisivamente la enzima xantina oxidasa que debe transformar la hipoxantina en xantina y ácido úrico dando lugar a la liberación de O_2^- . Y esto ocurre en situaciones de actividad física máxima o

extenuante donde la actividad de la xantina oxidasa plasmática se incrementó 10 veces (Radak et al. 1995; Rasanen et al. 1996).

Por todo ello convendría matizar que mientras actividades máximas o extenuantes si se han correlacionado con un aumento de la actividad pro-oxidante (Ogonovszky et al. 2005; Palazzetti et al. 2003), los programas de resistencia que comprenden actividades de intensidad ligera-moderada pero mayor duración juegan un papel beneficioso en el metabolismo redox (Chang et al. 2004; Oztasan et al. 2004).

Partiendo con la premisa de que el daño oxidativo durante el ejercicio intenso es un hecho real, el estudio del efecto de la suplementación dietética con antioxidantes, ya sea de manera individual o combinada formando cóctel, tanto para aumentar el rendimiento deportivo como para prevenir el daño oxidativo ha recibido gran interés (Goldfarb 1993). Y si bien el primero de los supuestos planteados resulta más contradictorio, con respecto al segundo, los resultados publicados parecen optimistas.

Con todo, la industria farmacéutica ha realizado grandes esfuerzos para intentar venderlos con esta doble pretensión teórica a todos los que practican deporte. Así no es de extrañar que diversas encuestas hayan puesto de manifiesto que la mayoría de los atletas de élite consumen suplementos vitamínicos que contienen cantidades 50-100 veces mayores que las recomendadas por las autoridades sanitarias norteamericanas (Williams 1989). Sin embargo no existe acuerdo unánime sobre su utilización en aquellos individuos que siguen dietas equilibradas y mucho menos consenso a la hora de recomendar megadosis (Williams 1989).

Asimismo, el uso continuado de megadosis de antioxidantes puede llegar a ser perjudicial en individuos que realizan actividad física regular (Cao y Cutler

1993). De hecho, Hennekens et al. (1994) en un editorial publicado en *The New England Journal of Medicine* mostró su escepticismo acerca de las ventajas que para la salud tendría el abuso de antioxidantes. Para ello tomó como referencia un clásico estudio finlandés publicado por Heinonen et al. (1994) en el que se demostró una incidencia mayor de cáncer de pulmón entre los fumadores que tomaban suplementos de B-carotenos que los que tomaron placebo.

La vitamina E es una sustancia de reconocida capacidad antioxidante. Al ser de naturaleza lipofílica se encuentra muy cómoda entre las membranas celulares y de las organelas, lo que justifica su idoneidad para neutralizar los radicales libres responsables de la peroxidación lipídica. De ahí su frecuente uso como suplemento en la literatura especializada como en la práctica. De los cuatro isómeros de tocoferol (α , β , δ , γ), el α -tocoferol es el de mayor poder antioxidante por sus tres metilos de su anillo fenólico (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996).

En todo caso, al ser de naturaleza lipofílica se encuentra muy cómoda entre las membranas celulares y de las organelas. Lo que facilitará su tarea de neutralizar los radicales derivados de la peroxidación lipídica de los PUFA como los radicales alquilo ($L\cdot$), peroxilos ($LOO\cdot$) y alquioxilos ($LO\cdot$). Esta reacción, en la que el tocoferol cede un hidrogenion al radical lipídico dara como resultado la formación de un radical tocoferoxilo (Buettner 1993).

Así, en ratas, la suplementación con vitamina E protege al hígado de la oxidación proteica inducida por ejercicio intenso. En este mismo sentido, la deficiencia de vitamina E se acompaña de un mayor daño peroxidativo no solo a nivel hepático sino también muscular (Goldfarb y Sen, 1994a). Así mismo, Zaidi y Banu (2004) refirieron que el suplemento con esta vitamina E (a razón de 15 mg/kg de peso) ofrecía mejores resultados en la peroxidación lipídica que un cóctel que combina vitaminas A y C en ratas sometidas a estrés emocional. E incluso

autores como Flader et al. (2003) van más allá y publican que megadosis de vitamina E de 3 y 10 g/kg de peso lejos de tener un efecto pro-oxidante, incrementó la capacidad antioxidativa del hígado.

La vitamina C (ácido ascórbico) es otro de los elementos que presentan propiedades antioxidantes y como tal ha sido propuesta en numerosos trabajos (Smirnoff 2000). Como la anterior, no puede ser sintetizada por los mamíferos y necesita ser ingerida en nuestra dieta (vegetales), si bien esta es hidrosoluble y se localiza en el citosol y en fluidos extracelulares. Por lo tanto será en fase acuosa donde ceda con gran facilidad sus electrones en un amplio rango de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Sin embargo, los efectos de la suplementación con vitamina C son más difíciles de predecir ya que ésta podría actuar tanto como antioxidante como prooxidante, al reducir el ión ferrico a ferroso, formándose un radical ascorbilo (mono- o di-deshidroascorbato) que podría finalmente descomponerse y dar lugar a la producción de radicales hidroperóxidos (OH⁻). Como muestra de ello, a dosis de 4 g/kg diarios prevalecieron los efectos prooxidantes en cobayas (Packer et al. 1986).

A la vista de todo lo anteriormente expuesto nos pareció de enorme interés centrar nuestra investigación en esta línea de trabajo, diseñando un proyecto de tesis basado en la hipótesis y objetivos que se relacionan a continuación.

3.- HIPÓTESIS PLANTEADA

Se sabe que hoy en día existen numerosos factores desencadenantes de la formación de radicales libres y su consecuente daño celular. Estos factores pueden ser intrínsecos, como el metabolismo celular y, extrínsecos como agentes tóxicos, irradiación, estrés emocional, ejercicio físico excesivo, entre otros.

Conociendo que hay autores que han asociado la formación de radicales libres con estrés psíquico y fundamentándonos en un programa de entrenamiento de fuerza asociado a una suplementación con antioxidantes nos llevaría a la disminución de los efectos provocados por la formación de radicales libres, pensamos que esta combinación podría dar lugar a beneficios significativos en la reducción del daño oxidativo que aparece como consecuencia del estrés psíquico asociado a procesos tanto fisiológicos como patológicos.

Por todo ello proponemos como hipótesis de trabajo, que la aplicación de un protocolo de intervención mixto basado en la realización de un programa de entrenamiento de fuerza y la ingesta oral de antioxidantes podría ser la mejor estrategia a la hora de reducir significativamente el daño oxidativo en ratas emocionalmente estresadas.

Para profundizar en este tema y contribuir a un mayor conocimiento del mismo, diseñamos este estudio experimental que tras obtener la suficiencia investigadora culmina hoy con la presentación de esta tesis.

4.- OBJETIVOS

Para el elevar a la categoría de Tesis Doctoral la hipótesis planteada en el apartado anterior planteamos los siguientes objetivos:

1. Valorar y analizar el comportamiento del Estatus Total Antioxidante plasmático en ratas emocionalmente estresadas sometidas a diversos tratamientos antioxidantes
2. Valorar y analizar el comportamiento de los niveles plasmáticos de malondialdehído como producto derivado de la lipoperoxidación, en ratas emocionalmente estresadas sometidas a diversos tratamientos antioxidantes
3. Valorar y analizar el comportamiento de los niveles plasmáticos de grupos carbonilos como producto derivado de la oxidación de proteínas, en ratas emocionalmente estresadas sometidas a diversos tratamientos antioxidantes

5.- JUSTIFICACIÓN Y UTILIDAD PRÁCTICA

El daño oxidativo es un asunto que ocupa y preocupa a buena parte de la comunidad científica nacional e internacional. Prueba de ello es que al hacer una revisión actualizada en una base de datos como Medline con la palabra clave “Oxidative Stress” extraída del MeSH aparecen un total de 67738 entradas de las que 11981 se corresponden con artículos de revisión.

Y es que recientes estudios han concluido que el daño oxidativo se asocia desde un punto de vista fisiopatológico a un envejecimiento precoz además de a numerosas patologías como cardiopatía isquémica, inmunodeficiencia, neurodegeneración, determinados tipos de cancer, etc. (Valko et al. 2007).

Por todo ello el interés por identificar estrategias antioxidantes esta creciendo de manera exponencial a la vez que lo hacen los artículos existentes en la literatura especializada.

En lo que respecta al ejercicio físico, parece que el realizado a intensidades máximas incrementa el daño oxidativo. Esto debería preocupar no solo a los

deportistas profesionales que deben hacer frente a unas máximas exigencias tanto físicas (duración de los programas de entrenamiento, intensidad de trabajo máxima, etc.) como mentales (estrés emocional, etc.). También a los deportistas ocasionales que intentan compensar la falta de entrenamiento a lo largo de la semana con únicas sesiones de trabajo a una intensidad máxima o extenuante (Tauler et al. 2005).

A día de hoy son numerosas las sustancias antioxidantes conocidas y que se administran en forma de suplementos por vía oral (Atalay et al. 2006; Thomas et al. 2007). Afortunadamente el propio ejercicio físico de tipo aeróbico realizado a intensidad ligera-moderada podría incluso mejorar el equilibrio redox (Ordoñez et al. 2007).

Precisamente nuestro trabajo de tesis se centra en el entrenamiento de fuerza por ser éste el que menos atención ha recibido en la literatura especializada.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.- MATERIAL

6.1.1.- Animales

Para la realización de los distintos ensayos se necesitaron 125 ratas machos de tipo Wistars de un mes de vida y un peso homogéneo entre 125-135 gramos.

6.1.2.- Antioxidantes

El cocktail de antioxidantes estaba compuesto por vitamina C (15 mg/Kg de peso) y Vitamina E (succinato ácido de alfa-tocoferol) (1,2 mg/Kg de peso) disuelto en una solución hidroalcohólica al 3% a causa del carácter hidrófobo de la vitamina E. Ambos productos pertenecían a la marca Sigma Co (St. Louis Mo. USA)

6.1.3.- Tubos PVC

Para la producción de estrés emocional en los animales, se recurrió al método de la inmovilización, utilizando para ello tubos de PVC con dimensiones de 250 x 70 mm, estando uno de los extremos cerrados y el otro provisto de una tapadera para permitir ajustar al animal.

6.1.4.- Material Informático: hardware y software

6.1.4.1.- Hardware

Para la el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizó un ordenador personal Macintosh G5 y un ordenador PC portátil Sony modelo PGC-8Q8M. Una impresora HP Laser 1600, un scanner Epson 2400 photo, una maquina fotográfica Sony , 7.0 megapixels.

6.1.4.2.- Software

Windows XP, MacOS X, Microsoft Office (Word, Power Point, Excell), SPSS 11.0

6.1.5.- Laboratorios

Laboratorio de la Escuela de Medicina de la Educación Física y el Deporte de la Universidad de Cádiz.

Laboratorio del Departamento de Anatomía y Embriología de la Universidad de Cádiz.

Laboratorio del Ejercicio Físico de la UFSCAR (Universidad Federal de Sao Carlos, Brasil).

Laboratorio de Medicina del Deporte de la Universidad de la Sapienza de Roma.

Servicios Centrales de la Universidad de Cádiz.

Servicios Centrales de la UFSCAR.

6.2.- MÉTODO

6.2.1.- Modelo experimental

Los animales (rata Wistar) se seleccionaron desde su nacimiento, manteniéndose en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas y en las mismas condiciones de nutrición y temperatura durante el tiempo que duró el experimento. Se distribuyó al azar en 5 lotes compuestos de 25 especímenes cada uno, según la siguiente tabla:

LOTE Nº 1	RATAS CONTROL
LOTE Nº 2	25 RATAS SOMETIDAS ESTRÉS PSÍQUICO
LOTE Nº 3	25 RATAS SOMETIDAS ESTRÉS Y EJERCICIO DE FUERZA
LOTE Nº 4	25 RATAS SOMETIDAS ESTRÉS Y ANTIOXIDANTES
LOTE Nº 5	25 RATAS SOMETIDAS ESTRÉS, EJERCICIO DE FUERZA, ADMINISTRACIÓN ANTIOXIDANTES

6.2.1.1.- Programa de Entrenamiento de Fuerza

El programa de entrenamiento de fuerza que aplicamos en nuestro estudio fue una modificación del diseñado por Tamaki et al. (1992) habida cuenta de su alta reproducibilidad en la comunidad científica nacional e internacional.

De manera resumida este protocolo se basa en el movimiento reflejo de las patas traseras tras la estimulación de la cola, lo que puede ser aprovechado para desplazar una carga de trabajo. Para evitar el trabajo excéntrico del cuádriceps del animal se prestó especial atención para que éste no se levantara del suelo. Y es que es precisamente durante la caída cuando se produce el trabajo excéntrico que predispone a lesiones musculares y podría enmascarar los resultados de nuestro trabajo (Coffey et al. 2007).

En concreto diseñamos un programa de 8 semanas, con 5 sesiones semana. Cada una de estas sesiones constaba de 4 series de 12 repeticiones con intervalo de 120 segundos entre unas y otras. Las cargas de trabajo fueron progresivas oscilando del 60 al 75% de su Repetición Máxima (RM) con un incremento de 5% cada 2 semanas de entrenamiento.

Merece ser destacado que 1 RM se define como la máxima carga desplazada por cada uno de los animales después de su estimulación (Barauna et al. 2005). Para las mediciones utilizamos el sistema Smith que entre otras novedades incluye un traje de nylon sujeto por tiras de velcro a una plataforma de madera.

Finalmente, los valores obtenidos relativos a la mejora de la fuerza muscular de las ratas del grupo experimental fueron similares a los publicados con anterioridad por autores como Barauna et al. (2007) y Yaspelkis et al. (2002).

6.2.1.2.- Administración Antioxidantes

Para la administración del suplemento de antioxidantes (Vitamina C y Vitamina E) se les inyectó vía subcutánea el cocktail a los lotes número 4 y 5 a las dosis dispuestas anteriormente, durante 8 semanas, 5 días a la semana.

6.2.1.3.- Provocación de estrés psíquico

Como agente estresante psíquico se recurrió a la inmovilización siguiendo el protocolo descrito recientemente para ratas Wistar por Trneckova et al. (2004).

Las ratas se inmovilizaron introduciéndolas en los tubos cilíndricos de PVC descritos en el apartado de material, ajustando el animal con un tapón de plástico de tal manera que no pudiera moverse. Asimismo cabe destacar que el tapón presentaba un pequeño orificio de 1 cm. de diámetro para que el animal pudiera respirar. Las sesiones fueron de 1 hora al día durante 5 días a la semana durante 8 semanas en la misma franja horaria de 10:00 a 12:00 horas (Ely et al., 1997).

6.2.2.- Recogida de muestras

Durante toda la experiencia se respetaron escrupulosamente los principios recogidos en la Guía para Investigación con Animales de Experimentación del Colegio Americano de Medicina del Deporte (Policy of the American College of Sport Medicine on Research with Experimental Animals).

Todos los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última sesión prevista en nuestra experiencia utilizando un anestésico tipo Pentobarbital Sódico (6mg/100 g peso) mediante inyección intraperitoneal para evitar un mayor estrés que pudiera sesgar nuestros resultados.

El sacrificio se produjo por decapitación y las muestras de sangre recogidas por drenaje espontáneo de la yugular. Las muestras se coleccionaron en tubos estériles de plástico desechable con una solución anticoagulante de EDTA y se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos. El suero fue extraído por aspiración con pipetas Pasteur y congelado a -80°C hasta su posterior utilización.

6.2.3.- Análisis de las muestras

6.2.3.1.- Hormona Adenocorticotropa (ACTH)

La concentración plasmática de ACTH se determinó mediante radioinmunoensayo con ¹²⁵I facilitado por la casa CIS Bio International Ltd.. Se expresó como pg/ml de plasma. Para evitar la posible influencia del ritmo circadiano en los pulsos de secreción de esta hormona, todas las determinaciones se hicieron entre las 10:00 y las 11:00 horas cuando los niveles de ACTH están relativamente bajos.

6.2.3.2.- Estatus antioxidante total (TAS)

El análisis del TAS se realizó mediante autoanalizador RA 500 de Technicom usando un kit de laboratorios Randox (Crumlin, United Kingdom).

Entre los reactivos usado figura el cromógeno, que se reconstituye con 10 ml de tampón fosfato salino a concentración de 5Mm con pH 7,4. Este cromógeno presenta una peroxidasa, la metamioglobina a concentración 6,1 $\mu\text{M/L}$ y el 2,2-azino-di-(3-etilbenzotiazolin sulfonato) a 610 $\mu\text{mol/L}$. Como substrato se utilizó el peróxido de hidrógeno a una concentración de 250 $\mu\text{mol/L}$.

La absorbancia se midió a una longitud de onda de 600 nm en cubetas de espectrofotómetro de 1 cm. de espesor.

Los reactivos se mantuvieron en un baño a temperatura de 37°C. Los resultados se expresaron en mmol/l . (Benot et al., 1998).

Nuestra decisión de elegir TAS (Total Antioxidant Status) frente al TRAP (Total Reactive Antioxidant Potential) se debió no solo a la mayor facilidad técnica del primero sino también a las críticas de imprecisión que han recaído sobre TRAP por la dificultad del electrodo de oxígeno de mantener su estabilidad durante el tiempo que requiere para realizar sus determinaciones (Rice-Evans y Millar 1994; Serafini y del Rio, 2004).

6.2.3.3.- Peroxidación lipídica (TBARS)

La peroxidación lipídica se valoró en niveles plasmáticos por el método propuesto por Draper y Hadley (1990). De manera resumida, las muestras (200 μl) se mezclaron con ácido tricloroacético al 10% (400 μl) y centrifugándose posteriormente durante 10 minutos (4000 x g). El sobrenadante se mezcló con un volumen igual de ácido tiobarbitúrico 0.67% calentándose en un baño de agua

durante 15 minutos. Para la determinación de los TBARS se valoró su absorbancia a una longitud de onda de 535 nm. En cualquier caso, los TBARS se expresaron como $\mu\text{mol/l}$ de plasma

6.2.3.4.- Oxidación proteica (Grupos Carbonilos)

Para estudiar la oxidación proteica se realizó el test de los grupos carbonilos sobre niveles plasmáticos siguiendo la metodología propuesta por Levine et al (1990). Para el tratamiento de las muestras se usarán 10 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina disueltos en una solución de 2.5 mM de ácido clorhídrico mientras los controles se trataron solo con los 2.5 mM de clorhídrico.

La determinación de los grupos carbonilos se realizó con una longitud de onda de 366 nm con un coeficiente de absorción de $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La concentración de proteínas de las muestras control se desarrolló midiendo la absorbancia a 280 nm usando una curva de calibración estándar de albúmina bovina sérica (BSA) en 6 M clorhidrato de guanidina y 20 mM fosfato potásico como tampón (pH 2.3). Todo ello nos permitió expresar los resultados en $\mu\text{mol/l}$ de plasma

6.2.3.- Tratamiento estadístico de los resultados

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el software SPSS Versión 16.0.

Los resultados se expresaron como media \pm sd y su intervalo de confianza al 95%.

Para estudiar el carácter de la distribución, se realizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

La comparación entre medias se llevó a cabo mediante el test de la t de Student para datos apareados. Asimismo se recurrió al análisis de la varianza (ANOVA) a la hora de establecer cual fue la mejor estrategia para combatir el daño oxidativo. Como nivel de significación estadística se utilizará $p < 0.05$.

7.- RESULTADOS

7.1.- HORMONA ADENOCORTICOTROPA (ACTH)

Tal y como se recoge en la literatura especializada para determinar el nivel de estrés se recurrió a la determinación de los niveles plasmáticos de la hormona adenocorticotropa (ACTH). Como preveíamos, su nivel aumentó hasta los 1592.3 ± 68.1 pg/ml en los animales sometidos a estrés emocional por inmovilización siendo este incremento significativo cuando se compara con sus valores basales previos a la inmovilización (Tablas 1 y 2). Por otro lado, los niveles de ACTH plasmáticos de los animales del grupo control permanecieron sin cambios hasta el final de nuestra experiencia (Tabla 3).

Tabla 1. Niveles plasmáticos de la hormona adenocorticotropa (ACTH) en el grupo experimental antes y después de ser sometidas a estrés emocional por inmovilización (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
Pre-estrés	247.8	± 9.6	[221.8 – 273.9]
Post-estrés	1592.3	± 68.1	[1488.7 – 1657.6]

NOTA: Concentración plasmática de ACTH expresada en pg/ml. Resultados expresados como media, desviación estandar (SD) e intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

Tabla 2. Comparación de medias de las concentraciones plasmáticas de la hormona adenocorticotropa (ACTH) en ratas del grupo experimental antes y después de ser sometidas a estrés emocional (n=25).

	Pre-estrés	Post-estrés	Valor estadístico p
ACTH (pg/ml)	247.8 ± 9.6	1592.3 ± 68.1	0.0011*

NOTA: Concentración plasmática de ACTH expresada en pg/ml. Resultados expresados como media ± desviación estandar (SD). * Los cambios observados son significativos para un valor del estadístico p <0.05.

Tabla 3. Estudio comparativo de la media de las concentraciones plasmáticas de la hormona adenocorticotropa (ACTH) en ratas del grupo control al inicio y al final de nuestra experiencia de 8 semanas (n=25).

	Inicio	Final	Valor estadístico p
ACTH (pg/ml)	249.5 ± 8.9	250.3 ±9.3	0.056

NOTA: Concentración plasmática de ACTH expresada en pg/ml. Resultados expresados como media ± desviación estandar (SD).

7.2.- ESTATUS ANTIOXIDANTE TOTAL (TAS) PLASMÁTICO

Considerado el mejor parámetro para la evaluación en general del nivel de defensas antioxidantes, el TAS en el grupo sometido a estrés psíquico por inmovilización mostró un descenso significativo del contenido total de antioxidantes plasmáticos (0.55 ± 0.03 mmol/l) cuando se compara con los valores presentados por los especímenes de ratas del grupo control (0.91 ± 0.02 mmol/l) (Tablas 4 y 5). El resto de valores presentado por los distintos lotes se recoge en Tablas 6, 7 y 8.

Al finalizar la experiencia, sus niveles plasmáticos aumentaron de manera significativa tanto en los especímenes de los lotes 3 (ejercicio de fuerza), 4 (suplemento vitamínico) y 5 (combinación ejercicio y suplementos vitamínicos) cuando se compara con los valores mostrados por los especímenes estresados

(Tablas 19, 20 y 21) Asimismo parece existir una clara y significativa diferencia a favor del lote 5 como mejor estrategia para aumentar esta variable.

Tabla 4. Estatus total antioxidante plasmático en el grupo de ratas control (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TAS	0.93	± 0.04	[0.89 – 0.95]

NOTA: Estatus total antioxidante (TAS) plasmático expresado en mmol/l.

Tabla 5. Estatus total antioxidante plasmático de ratas sometidas a estrés psíquico por inmovilización (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TAS	0.57	± 0.06	[0.51 – 0.63]

NOTA: Estatus total antioxidante (TAS) plasmático expresado en mmol/l.

Tabla 6. Estatus total antioxidante plasmático de ratas sometidas a estrés psíquico por inmovilización a la vez que a un programa de entrenamiento 5 días a la semana durante 8 semanas (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TAS	0.72	± 0.03	[0.69 – 0.76]

NOTA: Estatus total antioxidante plasmático (TAS) expresado en mmol/l.

Tabla 7. Estatus total antioxidante plasmático de ratas sometidas a estrés psíquico por inmovilización a la vez que se les suministra un suplemento vitamínico (vitaminas C y E) (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TAS	0.77	± 0.04	[0.72 – 0.79]

NOTA: Estatus total antioxidante (TAS) plasmático expresado en mmol/l.

Tabla 8. Estatus total antioxidante de ratas sometidas a estrés psíquico por inmovilización a la vez que a un programa de entrenamiento 5 días a la semana durante 8 semanas combinado con suplemento vitamínico a base de vitaminas C y E (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TAS	0.88	± 0.03	[0.85 – 0.92]

NOTA: Estatus total antioxidante (TAS) plasmático expresado en mmol/l.

7.3.- OXIDACIÓN LIPÍDICA: SUSTANCIAS REACTIVAS AL ACIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

El estrés emocional inducido por inmovilización aumento de manera significativa los niveles plasmáticos de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las ratas estresadas cuando se compara con el grupo control (Tablas 11 y 12). El resto de valores presentados por los distintos lotes se recoge en las Tablas 13, 14 y 15.

Tanto el ejercicio físico (lote 3) como la suplementación con antioxidantes (lote 4) como la combinación de ambos (lote 5) redujeron significativamente los niveles de los grupos carbonilos. En este sentido, el mejor comportamiento lo mostró la combinación de programa de entrenamiento de fuerza y cocktail de vitaminas (lote 5) (Tablas 19, 20 y 21)

Tabla 9. Niveles plasmáticos de TBARS en el grupo de ratas control (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TBARS (μmol/l)	7.2	± 0.8	[6.6 – 7.5]

Tabla 10. Niveles plasmáticos de TBARS en el grupo de ratas sometidas a estrés emocional (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	15.3	± 1.4	[14.2 – 16.8]

Tabla 11. Niveles plasmáticos de TBARS en el grupo de ratas sometidas a estrés emocional por inmovilización a la vez que a un programa de entrenamiento 5 días a la semana durante 8 semanas (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	8.5	± 1.1	[7.7 – 8.9]

Tabla 12. Niveles plasmáticos de TBARS en el grupo de ratas sometidas a estrés emocional por inmovilización a la vez que se les suministra un suplemento vitamínico (vitaminas C y E) (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	8.4	± 0.9	[7.9 – 8.8]

Tabla 13. Niveles plasmáticos de TBARS en el grupo de ratas sometidas a estrés emocional (n=25), por inmovilización a la vez que a un programa de entrenamiento 5 días a la semana durante 8 semanas combinado con suplemento vitamínico a base de vitaminas C y E (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	7.4	± 0.7	[7.1 – 7.5]

7.4.- OXIDACION PROTEICA (GRUPOS CARBONILOS)

El contenido de grupos carbonilos en niveles plasmáticos de los especímenes sometidos a estrés psíquico (lote 2) por inmovilización se incrementó significativamente respecto a su valor inicial (Tablas 14 y 15). El resto de valores presentados por los distintos lotes se recoge en las tablas 16, 17 y 18.

Tanto el ejercicio físico (lote 3) como la suplementación con antioxidantes (lote 4) como la combinación de ambos (lote 5) redujeron significativamente los niveles de los grupos carbonilos. En este sentido, el mejor comportamiento lo mostró la combinación de programa de entrenamiento de fuerza y cóctel vitamínico (lote 5) (Tablas 19, 20, 21).

Tabla 14. Niveles plasmáticos de grupos carbonilos en el grupo de ratas control (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
CARBONILOS ($\mu\text{mol/l}$)	3.77	± 0.9	[3.04 – 4.11]

Tabla 15. Niveles plasmáticos de grupos carbonilos de ratas sometidas a estrés psíquico por inmovilización (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
CARBONILOS ($\mu\text{mol/l}$)	6.12	± 1.4	[5.26 – 7.09]

Tabla 16. Niveles plasmáticos de grupos carbonilos de ratas sometidas a estrés emocional por inmovilización a la vez que a un programa de entrenamiento 5 días a la semana durante 8 semanas (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
CARBONILOS ($\mu\text{mol/l}$)	4.34	± 0.88	[3.92 – 4.86]

Tabla 17. Niveles plasmáticos de grupos carbonilos de ratas sometidas a estrés emocional por inmovilización a la vez que se les suministra un suplemento vitamínico (vitaminas C y E) (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
CARBONILOS ($\mu\text{mol/l}$)	4.46	± 0.97	[3.99 – 4.86]

Tabla 18. Niveles plasmáticos de grupos carbonilos de ratas sometidas a estrés psíquico por inmovilización a la vez que a un programa de entrenamiento 5 días a la semana durante 8 semanas combinado con suplemento vitamínico a base de vitaminas C y E (n=25).

	Media	SD	I.C. al 95%
CARBONILOS ($\mu\text{mol/l}$)	3.92	± 0.7	[3.78 – 4.14]

7.5.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DISTINTOS LOTES ENSAYADOS.

Tabla 19. Estudio comparativo de los valores medios del estatus antioxidante total plasmático y de marcadores de peroxidación lipídica y oxidación proteica de ratas control (lote A; n=25) y ratas sometidas a estrés psíquico (lote B; n=25)

	Lote A	Lote B	Valor de p
TAS	0.93 ± 0.04	0.57 ± 0.06	0.021*
TBARS	7.2 ± 0.8	16.3 ± 1.4	0.016*
CARBONILOS	3.77 ± 0.9	6.12 ± 1.4	0.032*

NOTA: TAS: Estatus total antioxidante plasmático expresado en mmol/l. TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresado en $\mu\text{mol/l}$ de plasma. CARBONILOS: contenido en grupos carbonilos expresado en $\mu\text{mol/l}$ de plasma. p: valor estadístico p. Los resultados se expresan como media \pm SD. * Los cambios observados son significativos para un valor del estadístico $p < 0.05$.

Tabla 20. Estudio comparativo de los valores medios del estatus antioxidante total plasmático y de marcadores de peroxidación lipídica y oxidación proteica de ratas sometidas a estrés psíquico (lote B; n=25) y ratas sometidas a estrés psíquico que a la vez desarrollaron un programa de entrenamiento de fuerza 8 semanas (lote C; n=25)

	Lote B	Lote C	Valor de p
TAS	0.55 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.025*
TBARS	164.6 ± 7.3	8.5 ± 1.1	0.012*
CARBONILOS	4.16 ± 0.12	4.34 ± 0.88	0.033*

NOTA: TAS: Estatus total antioxidante plasmático expresado en mmol/l. TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresado en $\mu\text{mol/l}$ de plasma. CARBONILOS: contenido en grupos carbonilos expresado en $\mu\text{mol/l}$ de plasma. Los resultados se expresan como media \pm SD. * Los cambios observados son significativos para un valor del estadístico $p < 0.05$.

Tabla 21. Estudio comparativo de los valores medios del estatus antioxidante total plasmático y de marcadores de peroxidación lipídica y oxidación proteica de ratas sometidas a estrés psíquico (lote B; n=25) y ratas sometidas a estrés psíquico a las que se suministró un suplemento vitamínico (vitaminas C y E) (lote D; n=25)

	Lote B	Lote D	Valor de p
TAS	0.55 ± 0.02	0.77 ± 0.04	0.041*
TBARS	164.6 ± 7.3	8.4 ± 0.9	0.018*
CARBONILOS	4.16 ± 0.12	4.46 ± 0.97	0.026*

NOTA: TAS: Estatus total antioxidante plasmático expresado en mmol/l. TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresado en $\mu\text{mol/l}$ de plasma. CARBONILOS: contenido en grupos carbonilos expresado en $\mu\text{mol/l}$ de plasma. Los resultados se expresan como media \pm SD. * Los cambios observados son significativos para un valor del estadístico $p < 0.05$.

Tabla 22. Estudio comparativo de los valores medios del estatus antioxidante total plasmático y de marcadores de peroxidación lipídica y oxidación proteica de ratas sometidas a estrés psíquico (lote B; n=25) y ratas sometidas a estrés psíquico que además de someterse al programa de entrenamiento de fuerza 8 semanas, recibieron suplementos vitamínicos (vitaminas C y E) (lote E; n=25)

	Lote B	Lote E	Valor de p
TAS	0.55 ± 0.02	0.88 ± 0.03	0.008*
TBARS	164.6 ± 7.3	7.4 ± 0.7	0.029*
CARBONILOS	4.16 ± 0.12	3.92 ± 0.7	0.012*

NOTA: TAS: Estatus total antioxidante plasmático expresado en mmol/l. TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresado en $\mu\text{mol/l}$ de plasma. CARBONILOS: contenido en grupos carbonilos expresado en $\mu\text{mol/l}$ de plasma. Los resultados se expresan como media \pm SD. * Los cambios observados son significativos para un valor del estadístico $p < 0.05$.

8.- DISCUSIÓN

Como cabría esperar al revisar la literatura especializada, el protocolo de inmovilización propuesto en nuestro trabajo generó un claro estrés psíquico en los animales tratados, como avala el incremento de ACTH a nivel plasmático.

Nuestro resultado fue por tanto similar al presentado previamente por autores como Retana-Márquez et al. (2003) y Roman et al. (2004) si bien no nos hizo falta recurrir a métodos más agresivos para el animal como la suspensión o la aplicación de descargas eléctricas en las patas.

Mención especial merece a este respecto, el hecho de que no se produjo ninguna muerte durante el tiempo que duró nuestra experiencia en ninguno de los grupos de intervención o controles.

La escasez de originales que valoren el daño oxidativo inducido por el estrés psíquico va a condicionar la capacidad de discusión de nuestro trabajo. A todo ello habría que añadir que autores como Sahin y Gumuslu (2004) refieren que las diferencias de metodologías y protocolos utilizados para producir el estrés psíquico van a tener su repercusión a la hora de interpretar los resultados de la peroxidación lipídica y proteica de los especímenes tratados.

Por si esto fuera poco, el hecho de que la inmensa mayoría de trabajos que pretenden combatir el daño oxidativo con ejercicio se basen en actividades

aeróbicas y no de fuerza va a limitar aún más nuestra capacidad de discusión. Lo que visto desde un lado positivo viene a confirmar la originalidad de nuestro trabajo de tesis.

Nuestro estudio pretende abarcar este asunto desde perspectivas lo más amplias posibles con vistas a incrementar y mejorar las interpretaciones que del mismo pudieran derivarse. Para tal fin complementaremos estudios de la capacidad antioxidante plasmática, como fiel reflejo del comportamiento redox extracelular, con otras determinaciones como la peroxidación lipídica de las membranas, a través de los TBARS, y la oxidación proteica, mediante la determinación de grupos carbonilos.

Para evitar posibles errores a la hora de interpretar los resultados, parece evidente recomendar baterías de pruebas en vez de basar nuestro estudio en una única estrategia diagnóstica (Prior y Cao 1999).

En líneas generales hemos encontrado mayores reducciones de los grupos carbonilos, marcadores de la oxidación proteica, que de los TBARS, marcadores de la peroxidación lipídica. Este hecho sugeriría la existencia de un mecanismo que repara de manera selectiva el daño oxidativo, atendiendo a la importancia fisiológica.

Nuestro grupo de investigación publicó con anterioridad buenos resultados con un programa de intervención basado en ejercicio de tipo aeróbico que consiguió reducir los niveles plasmáticos de productos derivados de la oxidación de biomacromoléculas además de proteger las crestas mitocondriales del daño oxidativo (Rosety-Rodríguez et al. 2006a,b; Rosety-Rodríguez et al. 2007; Rosety et al. 2008)

8.1.- ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL (TAS)

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que el estrés psíquico inducido por inmovilización reduce significativamente el TAS plasmático de las ratas expuestas. Este hecho refleja claramente el daño oxidativo experimentado por los animales expuestos y coincide plenamente con los resultados recientemente publicados por Fontella et al. (2005) en el hipocampo de ratas Wistar sometidas a estrés emocional.

El estrés crónico también redujo de manera significativa el estatus antioxidante total en tejido pulmonar de ratas (Torres et al. 2004). Estos mismos autores sin embargo no refirieron cambios significativos cuando el estrés al que se sometieron los animales fue agudo.

Por consiguiente, a tenor de todos estos datos, el TAS parece un buen indicador de la lucha frente a los radicales que tiene lugar en el compartimento extracelular (Yu, 1994b).

Para autores como Ghiselli et al. (2000) su estudio tiene mayor interés que la evaluación individualizada de los distintos antioxidantes por diversas razones. Por un lado porque nos ofrece una visión más real al facilitarnos la acción no solo de antioxidantes conocidos sino también de aquellos que aún no se han identificado o se suelen obviar, así como el resultado de las posibles interacciones entre ellos. De igual modo, al permitirnos monitorizar los niveles plasmáticos, nos dará una valiosa información sobre la absorción y biodisponibilidad de antioxidantes ya sean en forma de preparados comerciales o incluidos en la propia dieta.

Tras someterse al programa de entrenamiento durante 40 días los especímenes participantes experimentaron un aumento del nivel de antioxidantes plasmático. En esta misma línea se encuadran los resultados presentados por Asha-devi et al. (2003a, b) en ratas tras 60 días de entrenamiento durante 5 días a la semana.

Y en general se podrían citar múltiples estudios que han descrito mejoras de la capacidad antioxidante tras someterse a este tipo de programas de intervención basados en el ejercicio físico regular a ligera-moderada intensidad (Chang et al. 2004; Ozcaya et al. 2002). Con la ventaja añadida respecto a los excelentes resultados publicados por Kakarla et al. (2005) en el hígado de ratas Wistar de que nuestro programa fue tan solo de 8 semanas en vez de las 12 que comprendía el programa del primero.

Y aunque en nuestro diseño no se incluyeron para ser estudiadas, el ejercicio físico regular durante 12 semanas incrementa de manera significativa la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa en el hígado de ratas tanto sanas (Kakarla et al. 2005) como con patología hipertensiva (Elhaimour et al. 2003), protegiéndolas del daño oxidativo.

Asimismo las ratas tratadas con la suplementación de vitaminas E y C aumentaron de manera significativa el nivel plasmático de TAS. De hecho, tanto el α -tocoferol como el ácido ascórbico forman parte del pool de antioxidantes determinados por esta técnica. Zaidi et al. (2005) va más allá y concluye que la suplementación de vitamina E y C por sí solas son capaces de mejorar el estatus antioxidante total de ratas sometidas a estrés crónico, si bien los mejores resultados los consigue con el cóctel de vitamina E y C.

Aunque los trabajos de Kahnna et al (1998) ya indicaban los buenos resultados presentados por los suplementos vitamínicos y el ejercicio en la capacidad antioxidante por separado, hasta la fecha actual muy pocos estudios han combinado ambos factores en un mismo protocolo de intervención. E incluso se obtenía resultados negativos cuando se utilizaba como complemento de las vitaminas una actividad física extenuante o máxima (Goldfarb et al. 1994). En nuestro trabajo se desarrolló esta experiencia y los resultados fueron muy positivos al incrementar de manera significativa el estatus antioxidante total plasmático.

8.2.- PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Nuestro trabajo ha puesto de manifiesto el daño oxidativo inducido por la inmovilización en niveles plasmáticos de las ratas participantes a través del aumento significativo de los TBARS.

Y aunque algunos autores refieren la existencia de una cierta especificidad en la respuesta al daño oxidativo según tejidos, Torres et al. (2004) y Zaidi et al. (2005) presentaron resultados similares en el pulmón de ratas sometidas a estrés psíquico crónico.

Nuestros resultados son similares a los publicados por Davydov et al. (2004) si bien en nuestro caso los parámetros de daño oxidativo lipídico son mayores. El hecho de que nuestro periodo de inmovilización fuese mayor podría indicar que su efecto citotóxico es dependiente de la duración de la misma.

En el otro extremo cabe puntualizar que el estrés psíquico agudo no ha sido capaz de aumentar de manera significativa la peroxidación lipídica de las ratas sometidas a éste tal y como refieren recientemente Sahin et al. (2004).

La edad de las ratas seleccionadas también merece por nuestra parte una consideración particular si partimos de la premisa de la clásica teoría del envejecimiento basada en el estrés oxidativo. Y es que al ser tan nuestros especímenes tan jóvenes, y en consecuencia no presentar un aumento de la peroxidación lipídica debida al envejecimiento, se entiende mejor por qué Martin et al. (2003) publicaron unos valores más altos de TBARS en el tejido hepático de ratas Wistar de 22 meses.

Por todo ello entendemos que trabajando con especímenes jóvenes será más fácil objetivar con mayor precisión el daño oxidativo inducido por la inmovilización. Y en consecuencia, el comportamiento de éste tras someterse los animales estresados a un programa de actividad física o a suplementos vitamínicos o a ambos.

Asimismo merece ser destacado que los especímenes utilizados en nuestra experiencia se mantuvieron en unas condiciones de alimentación ad-libitum lo que nos permite descartar la influencia de la privación de alimento en el incremento del daño oxidativo inducido por cualquier agente estresante. Y es que, como publicaron recientemente Domenicali et al. (2001), el ayuno fue responsable del aumento significativo de la peroxidación lipídica observada al valorar los niveles de TBARS en el homogenizado hepático de ratas sometidas a isquemia/reperfusión.

Sea como fuere, en los estudios sobre el daño oxidativo cada vez se le presta mayor importancia a la valoración de la peroxidación lipídica ya que gracias a una reacción en cadena podría autopropagarse y así a partir de la oxidación de unas pocas moléculas dar lugar a un evidente daño no solo de la membrana celular sino de cualquier organela (Mylonas y Kouretas 1999). Máxime cuando por su alta capacidad de difusión estos productos de la peroxidación lipídica podrían actuar más allá de su propia fuente de producción (Briganti y Picardo 2003). Y aún más, si

cabe, desde que se conoció el importante papel que el estrés oxidativo desempeñaría en la fisiopatología de numerosos procesos patológicos (aterosclerosis, cataratas, envejecimiento, diabetes, artritis, entre otras.),

Los especímenes sometidos a nuestro programa de entrenamiento redujeron significativamente el nivel de los TBARS en niveles plasmáticos, lo que confirma nuestra hipótesis de partida. Convendría ser enfatizado que estos buenos resultados se consiguieron solo tras 8 semanas de actividad mientras Gunduz et al. (2004) obtuvo unos resultados similares en un programa de intervención anual.

Y aunque existe unanimidad a la hora de reconocer las bondades del ejercicio regular en la peroxidación lipídica, el mecanismo de acción íntimo que subyace a todo esto aún se discute (Servais et al. 2003). En todo caso, buena parte de los autores consultados refieren la buena adaptación de las defensas antioxidantes ante la acción de factores tanto endógenos como ambientales, encontrándose entre estos últimos la actividad física (Kim et al. 1996). Para otros autores como Hodgson (1985) el ejercicio físico mantenido en el tiempo aumentaría las proteínas mitocondriales lo que supondría un mejor aprovechamiento del oxígeno.

En el otro extremo convendría matizar que el ejercicio físico intenso o extenuante aumenta la peroxidación por lo que debería descartarse (Benderitter et al. 1996). De hecho, uno de los primeros trabajos que se realizó sobre esta línea de investigación concluyó que la práctica de ejercicio maximal inducía un claro efecto dañino en forma de peroxidación lipídica de los tejidos (Dillard et al. 1978).

De acuerdo con el reciente trabajo de Zaidi et al. (2005) la combinación de vitamina E y C mostró un excelente comportamiento a la hora de reducir la peroxidación lipídica en el hígado de rata sometida a estrés psíquico. De este trabajo

también se desprende que el cóctel de vitaminas mejoró los resultados de ambas vitaminas por separado (E y C) así como la posibilidad de administrarlas de manera preventiva y no solo cuando esté instaurado el daño oxidativo.

Asimismo al revisar la literatura durante la elaboración de esta discusión comprobamos que incluso megadosis de vitamina E, como las ensayadas por Flader et al. (2003), mostraban efectos antioxidantes al reducir la producción habitual de TBARS en el tejido hepático de ratas sanas en comparación con ratas que no recibían este suplemento.

Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de la actividad física y el suplemento de vitaminas (C y E) hasta el extremo de presentar unos valores de peroxidación lipídica muy proximos a los presentados por ratas control. Curiosamente en la literatura se le ha prestado muy poca atención a esta combinación, a excepción de los resultados que en esta misma línea publicaron Zaidi et al. (2003) por lo que futuros estudios serían necesarios para confirmar nuestro hallazgo y a la sazón, extrapolarlo a los humanos.

8.3.- OXIDACION PROTEICA

El estrés psíquico inducido por la inmovilización aumentó significativamente el contenido de grupos carbonilos en los niveles plasmáticos, lo que sugiere una clara oxidación proteica.

Nuestros resultados son similares a los publicados por Davydov et al. (2004) si bien en nuestro caso los parámetros de daño oxidativo proteico son mayores. El hecho de que nuestro periodo de inmovilización fuese mayor podría indicar que su efecto citotóxico es dependiente de la duración de la misma. En cualquier caso son menores que los publicados por Das et al. (1997) quienes

refirieron aumentos de hasta un 70% de los carbonilos tras inducir a los animales úlceras gástricas por choques térmicos con frío.

Asimismo, nuestros valores a nivel plasmático fueron menores que los presentados por ratas de avanzada edad que en comparación con ratas jóvenes habían experimentado un aumento del 36-45% (Navarro y Boveris 2004). Y es que como avanzaron Liu et al. (1996), los productos de la oxidación proteica se van acumulando a medida que avanza la edad de los individuos, fundamentalmente a nivel hepático.

De ahí el interés de haber seleccionado a ratas jóvenes para evitar sesgos a la hora de fijar el origen de los grupos carbonilos encontrados.

En todo caso, estos trabajos anteriormente referidos coinciden al aceptar que el índice de daño oxidativo a pesar de ser menos utilizado en la literatura que el correspondiente a los lípidos, cada vez recibe mayor atención como complemento necesario a la anterior (Chevion et al. 2000).

Las consecuencias funcionales que cabría esperar de todo ello son alteraciones de su capacidad enzimática o transportadora, agregabilidad, inmunogenicidad, proteólisis, entre otras. De ahí su inclusión en nuestro estudio por la relevancia que para la viabilidad celular tiene la cadena respiratoria mitocondrial (Lee y Wei 2001). Y en su conjunto, justificaría la estrecha relación de la oxidación proteica y el envejecimiento, diabetes, procesos neurodegenerativos, etc. (Davies et al. 1999).

El ejercicio físico moderado durante ocho semanas también fue capaz de reducir significativamente el contenido de grupos carbonilos derivados de la oxidación proteica. En este mismo sentido, Husain (2004) describió un programa

de entrenamiento de 8 semanas que consiguió disminuir de manera significativa los carbonilos en el corazón de ratas. Asimismo, un regimen de 8 semanas de entrenamiento redujo de manera significativa el contenido de carbonilos en las células cardiacas de ratas que sufrían una inhibición crónica de la óxido nítrico sintetasa (Husain y Hazelrigg 2002).

También se han descrito programas de actividad física de 9 semanas con una hora de entrenamiento en medio acuático durante 5 días a la semana que no solo conseguían reducir significativamente los niveles de grupos carbonilos sino que a la vez mejoraban de manera significativa las funciones cognitivas de las ratas (Radak et al. 2001).

Por el contrario autores como Moran et al. (2004) no encontraron mejoras significativas en los niveles de carbonilos a nivel cardiaco tras sendos programas de 12 y 24 semanas de entrenamiento. Una posible explicación de todo esto sería que en vez de entrenamiento de fuerza como nosotros escogió un tapiz rodante donde son frecuentes las contracciones anisométricas o pliométricas.

En nuestro caso particular, las determinaciones del daño oxidativo se realizaron cuando las ratas llevaban 8 semanas de entrenamiento.

Con todo conviene tener especial precaución a la hora de prescribir ejercicio físico, recomendando que éste sea de intensidad ligera-moderada, ya que cuando este es máximo o extenuante es capaz de aumentar significativamente el contenido de grupos carbonilos fundamentalmente a nivel muscular, pero también a nivel hepático (Terblanche et al. 2001).

De nuestros resultados también se desprende que la suplementación con vitamina E y C reducía significativamente el nivel de grupos carbonilos de niveles

plasmáticos. Asimismo, la asociación de vitaminas E y C ya mostró buenos resultados al reducir la oxidación proteica a nivel hepático en ratas sometidas a intoxicación por arsénico (Ramanathan et al. 2003). Srigiridhar y Nair (2000) también encontraron una mejoría significativa del daño oxidativo proteico a nivel del tracto gastrointestinal de ratas cuando utilizaron el cóctel de vitaminas C y E.

Sin embargo, un protocolo propuesto por estos mismos autores basado únicamente en la vitamina C o ácido ascórbico fue incapaz de arrojar mejora alguna. Estos datos sugieren la idoneidad de combinar en un mismo suplemento a las vitaminas E y C no en vano, los radicales tocoferoxilo resultantes de la neutralización de radicales derivados de la peroxidación volverán a su forma reducida gracias a la acción del ácido ascórbico o vitamina C entre otros, como ya avanzó en un clásico trabajo Fryer (1992).

Al revisar en la literatura artículos como el publicado por Je et al. (2001) parece que el mayor peso de este efecto recaería sobre la vitamina E. De hecho, la suplementación con vitamina E protege per se al tracto gastrointestinal de la peroxidación proteica mientras la vitamina C por si sola era incapaz de hacerlo de manera significativa como avanzaron Srigiridhar y Nair (2000). Los trabajos de De Oliveira et al. (2003) a nivel cerebral también refirieron resultados similares.

9.- CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados en las experiencias planteadas con especímenes de ratas estresadas y sometidas a protocolos de actividad física, suplementación vitamínica y la combinación de ambos obtenemos las siguientes conclusiones:

1.- El estrés emocional provoca significativamente una disminución del estatus antioxidante total plasmático, con un aumento del daño oxidativo tanto lipídico como proteico.

2.- Tras la aplicación de un programa de entrenamiento de fuerza de intensidad ligera-moderada de 8 semanas de duración en especímenes de ratas sometidas a estrés psíquico se consigue una reducción de la oxidación lipídica y proteica en los niveles plasmáticos. Igualmente apreciamos un aumento del estado antioxidante total plasmático lo que sugiere una mejora de las defensas antioxidantes.

3.- La administración del cocktail de vitaminas (C y E) en especímenes de ratas sometidas a estrés psíquico provoca una disminución de la oxidación lipídica y proteica. Igualmente el estado antioxidante total plasmático, experimenta una mejoría estadísticamente significativa.

4.- Por último concluimos que la mejor respuesta se consigue con un protocolo de intervención mixto que combina programa de entrenamiento de fuerza de intensidad ligera-moderada de 8 semanas de duración y la suplementación con un cocktail vitamínico (C y E)

10.- BIBLIOGRAFÍA

Abidin I, Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Aydin S, Ozturk O, Sahin E. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int J Neurosci*. 2004; 114: 683-699.

Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. 1993; 25: 218–224.

Amstad PA, Krupitza G, Cerutti PA. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res*. 1992; 52: 3952-3960.

Arthur MJ, Hall AJ, Wright R. Hepatitis B, hepatocellular carcinoma, and strategies for prevention. *Lancet*. 1984; 1: 607-610.

Asha Devi. Studies of the effects of exercise and vitamin E on the heart in animal models of aging. *Indian J Gerontol*. 2002; 16: 79–95.

Asha Devi S, Prathima S, Subramanyam MV. Dietary vitamin E and physical exercise: I. Altered endurance capacity and plasma lipid profile in ageing rats. *Exp Gerontol*. 2003a; 38: 285-290.

Asha Devi S, Prathima S, Subramanyam MV. Dietary vitamin E and physical exercise: II. Antioxidant status and lipofuscin-like substances in aging rat heart. *Exp Gerontol*. 2003b; 38: 291-297.

Atalay M, Laaksonen DE, Khanna S, Kaliste-Korhonen E, Hänninen O, Sen CK. Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish oil and acute exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2000; 32: 601-7.

Babbs CF. Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8: 191-200.

Barauna VG, Junior ML, Costa Rosa LF, Casarini DE, Krieger JE, Oliveira EM. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32:249–254

- Barauna VG, Rosa KT, Irigoyen MC, de Oliveira EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. *Clin Med Res.* 2007; 5: 114-20.
- Barclay JK, Hansel M. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol.* 1991; 69: 279-284.
- Benderitter M, Hadj-Saad F, Lhuissier M, Maupoil V, Guillard JC, Rochette L. Effects of exhaustive exercise and vitamin B6 deficiency on free radical oxidative process in male trained rats. *Free Radic Biol Med.* 1996; 21: 541-549.
- Benot S, Molinero P, Soutto M, Goberna R, Guerro JM. Circadian variations in the rat serum total antioxidant status: Correlation with melatonin levels. *J Pineal Res.* 1998; 25: 1-4.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997; 272: 20313-20316.
- Borzone G, Zhao B, Merola AJ, Berliner L, Clanton TL. Detection of free radicals by electron spin resonance in rat diaphragm after resistive loading. *J Appl Physiol.* 1994; 77: 812-818.
- Briganti S, Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003; 17: 663-669.
- Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 300: 535-543.
- Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 570: 7-22.
- Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr.* 1990; 10: 357-382.
- Cao G, Cutler RG. High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. *Arch Gerontol Geriatr.* 1993; 17: 189-201.
- Cerutti PA, Trump BF. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells.* 1991; 3: 1-7.
- Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol.* 2004; 3: 86-92.

- Chang SP, Chen YH, Chang WC, Liu IM, Cheng JT. Increase of anti-oxidation by exercise in the liver of obese Zucker rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004; 31: 506-511.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49: 481-493.
- Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000; 33: 99-108.
- Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995; 35: 131-141.
- Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72: 637-646.
- Coffey VG, Reeder DW, Lancaster GI, Yeo WK, Febbraio MA, Yaspelkis BB 3rd, Hawley JA. Effect of high-frequency resistance exercise on adaptive responses in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39: 2135-44.
- Collins RH Jr, Feldman M, Fordtran JS. Colon cancer, dysplasia, and surveillance in patients with ulcerative colitis. A critical review. *N Engl J Med.* 1987; 316: 1654-1658.
- Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, Grinton S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25: 1135-1140.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 107: 1198-11205.
- Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 1151-1163.
- Davydov VV, Zakharchenko IV, Ovsyannikov VG. Free radical processes in the liver of adult and old rats during stress. *Bull Exp Biol Med.* 2004; 137: 139-142.
- Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23: 8-18.

- Dickens F, Glock GE. Direct oxidation of the glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate and pentose-5-phosphates by enzymes of animal origin. *Biochem. J.* 50, 81-95.
- Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol.* 1978; 45: 927-932.
- Domenicali M, Caraceni P, Vendemiale G, Grattagliano I, Nardo B, Dall'Agata M, Santoni B, Trevisani F, Cavallari A, Altomare E, Bernardi M. Food deprivation exacerbates mitochondrial oxidative stress in rat liver exposed to ischemia-reperfusion injury. *J Nutr.* 2001; 131: 105-110.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-431.
- Elhaimour F, Courderot-Masuyer C, Nicod L, Bobillier-Chaumont S, Robin S, Richert L, Berthelot A. Effect of exercise training on liver antioxidant status of deoxycorticosterone acetate salt induced hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81: 469-475.
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53: 314-321.
- Flader D, Brandsch C, Hirche F, Eder K. Effects of megadoses of dietary vitamin E on the antioxidant status of rats fed lard or salmon oil. *Int J Vitam Nutr Res.* 2003; 73: 275-283.
- Fontella FU, Siqueira IR, Vasconcellos AP, Tabajara AS, Netto CA, Dalmaz C. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochem Res.* 2005; 30: 105-111.
- Frank L, Iqbal J, Hass M, Massaro D. New "rest period" protocol for inducing tolerance to high O₂ exposure in adult rats. *Am J Physiol.* 1989; 257: 226-231.
- Fryer MJ. The antioxidant effect of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). 1992; 15: 381-392.
- Garcia A, Armario A. Individual differences in the recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis after termination of exposure to a severe stressor in outbred male Sprague-Dawley rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2001; 26: 363-374.

- Geenen D, Buttrick P, Scheuer J. Cardiovascular and hormonal responses to swimming and running in the rat. *J Appl Physiol.* 1988; 65: 116-123.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29: 1106-1114.
- Goldfarb AH. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exercise.* 1993; 25: 232-236.
- Goldfarb AH, Sen CK. Antioxidant supplementation and the control of oxygen toxicity during exercise. In: Goldfarb A, Sen CK, Aniñen O. (ed.) *Exercise and oxygen toxicity* Amsterdam: Elsevier Science. 1994; 163-189.
- Goldfarb AH, McIntosh MK, Boyer BT, Fatouros J. Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA treated and exercised rats. *J Appl Physiol.* 1994; 76: 1630-1635.
- Guezennec CY. Overtraining syndrome. *Bull Acad Natl Med.* 2004; 188: 923-930.
- Gunduz F, Senturk UK, Kuru O, Aktekin B, Aktekin MR. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol Res.* 2004; 53: 171-176.
- Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull.* 1993; 49: 523-544.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radical and iron in relation to biology and medicine. Some problems and concepts. *Archive of Biochemistry and Biophysic.* 1986; 246: 501-514.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Clarendon Press; 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The oxidant of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysic.* 1990; 280: 1-8.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation: an update. *FEBS Lett.* 1992; 307: 108-112.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57: 715-724.

Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995; 35: 7-20.

Hand GA, Hewitt CB, Fulk LJ, Stock HS, Carson JA, Davis JM, Wilson MA. Differential release of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the amygdala during different types of stressors. *Brain Res.* 2002; 949: 122-130.

Heinonen OP, Huttunen JK, Albanes D. The effect of vitamin E and carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1029-1935.

Hennekens CH, Buring JE, Peto R. Antioxidant vitamins benefits not yet proved. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1080-1081.

Hodgson DR. Muscular adaptations to exercise and training. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1985; 1: 533-548.

Hoffman R, Al'Absi M. The effect of acute stress on subsequent neuropsychological test performance. *Arch Clin Neuropsychol.* 2004; 19: 497-506.

Husain K, Hazelrigg SR. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1587: 75-82.

Husain K. Interaction of regular exercise and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure and rat aortic antioxidants. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1688: 18-25.

Inayama T, Kumagai Y, Sakane M, Saito M, Matsuda M. Plasma protein-bound sulfhydryl group oxidation in humans following a full marathon race. *Life Sci.* 1996; 59: 573-578.

Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi K, Okochi T: Effect of physical exercise on the content of 8- hydroxyde- oxygua- nosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jap J Cancer Res* 1993; 84: 720-725.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9: 515-540.

- Janero DR. Therapeutic potential of vitamin E against myocardial ischemic-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10: 315-324.
- Je HD, Shin CY, Park HS, Huh IH, Sohn UD. The comparison of vitamin C and vitamin E on the protein oxidation of diabetic rats. *J Auton Pharmacol.* 2001; 21: 231-236.
- Ji LJ, Stratman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch Biochem Biophys.* 1988; 263: 150-160.
- Kakarla P, Vadluri G, Reddy Kesireddy S. Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2005; 303: 203-208.
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids.* 1996; 31: 671-701.
- Khanna S, Atalay M, Lodge JK, Laaksonen DE, Roy S, Hanninen O, Packer L, Sen CK. Skeletal muscle and liver lipoyllysine content in response to exercise, training and dietary alpha-lipoic acid supplementation. *Biochem Mol Biol Int.* 1998; 46: 297-306.
- Kim JD, Yu BP, McCarter RJ, Lee SY, Herlihy JT. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20: 83-88.
- Lawler JM, Powers SK, Criswell DS. Inducibility of NADP-specific isocitrate dehydrogenase with endurance training in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1993; 149: 177-181.
- Lee HC, Wei YH. Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. *Biogerontology.* 2001; 2: 231-244.
- Leeuwenburgh C, Ji LL. Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J Nutr.* 1996; 126: 1833-1843.
- Lilius EM, Marnila P. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. *Experientia.* 1999; 48: 1082-1091.

Lundberg U. Psychological stress and musculoskeletal disorders: psychobiological mechanisms. Lack of rest and recovery greater problem than workload. *Lakartidningen*. 2003; 100: 1892-1895.

Marks PA, Szeinberg A, Banks J. Erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase of normal and mutant human subjects: properties of the purified enzymes. *J Biol Chem*. 1961; 236: 10-17.

Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med*. 1996; 21: 307-315.

Martin C, Dutertre-Catella H, Radionoff M, Debray M, Benstaali C, Rat P, Thevenin M, Touitou Y, Warnet JM. Effect of age and photoperiodic conditions on metabolism and oxidative stress related markers at different circadian stages in rat liver and kidney. *Life Sci*. 2003; 73: 327-335.

Mathews C, Van Holde K. *Biochemistry*. Redwood City: Cummings Publishig; 1990.

McCord JM, Keele BB, Fridovich JJ. Superoxido dismutase, an enzyme fuction for erythrocuprein. *Journal of Biology and Cemistry*. 1969; 244: 6049-6055.

Moran M, Delgado J, Gonzalez B, Manso R, Megias A. Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. *Acta Physiol Scand*. 2004; 180: 157-166.

Mufti SI. Alcohol acts to promote incidence of tumors. *Cancer Detect Prev*. 1992; 16: 157-162.

Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 1999; 13: 295-309.

Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol*. 1996; 46: 15-32.

Nashawati E, Dimarco A, Supinski G. Effects produced by infusion of a free radical-generating solution into the diaphragm. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147: 60-65.

Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 287: 1244-1249.

Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radak Z. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int.* 2005; 46: 635-640.

Ohno H, Suzuki K, Fujii J, Yamashita H, Kizaki Y, Oh-ishi S, Taniguchi N. *Exercise and Oxygen Toxicity.* Amsterdam: Elsevier Publishers; 1994.

Okatani Y, Watanabe K, Wakatsuki A, Tamura S, Sagara Y. Effects of superoxide and peroxynitrite on vascular tension in the human umbilical artery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1998; 77: 883-888.

Oliveira de SL, Diniz DB, Amaya-Farfan J. Carbohydrate-energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. *Br J Nutr.* 2003; 89: 89-96.

O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst JC. Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol.* 1996; 81: 1197-1206.

Ordóñez FJ, Rosety M, Rosety-Rodríguez M. Regular physical activity increases glutathione peroxidase activity in adolescents with Down syndrome. *Clin J Sports Med.* 2006; 16: 355-356.

Ordóñez FJ, Rosety-Rodríguez M. Regular exercise attenuated lipid peroxidation in adolescents with Down's syndrome. *Clin Biochem.* 2007; 40: 141-2. Ozkaya YG, Agar A, Yargicoglu P, Hacıoglu G, Bilmen-Sarikcioglu S, Ozen I, Aliciguzel Y. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab.* 2002; 28: 377-384.

Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, Siktar E, Keles S, Akar S, Akcay F, Dane S, Gul M. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol.* 2004; 91: 622-627.

Packer JE, Slater TF, Wilson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature.* 1979; 278: 737-738.

Packer L, Gohil K, Delumen B, Terblanche SE. A comparative study on the effects of ascorbic acid deficiency and supplementation on endurance and mitochondrial oxidative capacities in various tissues of the guinea pig. *Biochem Physiol.* 1986; 83: 235-240.

- Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci* 1997; 15: 353–363.
- Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol*. 2003; 28: 588-604.
- Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*. 1996; 31: 77-82.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*. 1994; 55(15): 271-276.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med*. 2000; 21: 49-98.
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*. 1995: 277-290.
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, Dudley G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1994; 266: 375-380.
- Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27: 1173-1181.
- Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol*. 1995; 79: 129-135.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsek J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S. Related Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int*. 2001; 38:17-23.
- Ramanathan K, Shila S, Kumaran S, Panneerselvam C. Protective role of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced microsomal dysfunctions. *Hum Exp Toxicol*. 2003; 22: 129-136.
- Rasanen LA, Wuitanen PA, Lilius EM, Hyyppa S, Poso AR. Accumulation of uric acid in plasma after repeated bouts of exercise in the horse. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1996; 114: 139-144.
- Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol*. 1992; 73: 1805-1809.

Reiter RJ. Pineal function during aging: Attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp.* 1994; 54: 31-39.

Retana-Marquez S, Bonilla-Jaime H, Vazquez-Palacios G, Dominguez-Salazar E, Martinez-Garcia R, Velazquez-Moctezuma J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2003; 28: 207-227.

Retsky KL, Freeman MW, Frei B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J Biol Chem.* 1993; 268: 1304-1309.

Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994; 234: 279-293.

Roman O, Seres J, Pometlova M, Jurcovicova J. Neuroendocrine or behavioral effects of acute or chronic emotional stress in Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. *Endocr Regul.* 2004; 38: 151-155.

Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology.* 1995; 108: 252.

Rosety-Rodriguez M; Ordoñez FJ; Rosety I; Frias L; Rosety MA; Rosety JM; Rosety M. 8Week training program attenuates mitochondrial oxidative stress in the liver of emotional stressed rats. *Histol. Histopathol.* 2006a; 21: 1167-1170

Rosety-Rodríguez M, Ordoñez FJ, Rosety MA, Frias L, Rosety I, Rosety M. Age should be taken into account when performing studies regarding protein oxidation in emotional in emotional stressed rats. *Eur J Clin Invest.* 2006b; 36: 25-25.

Rosety-Rodriguez M, Rosety I, Frias L, Rosety MA, Ordoñez FJ. Liver Superoxide Dismutase Activity was increased by Exercise in Emotionally Stressed Rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39: 253.

Rosety I, Rosety Rodríguez M, Frias L, Macías-Amat I, Rosety JM, Diaz A, Ordoñez FJ. Erythrocyte glutathione peroxidase activity was increased by regular exercise in emotionally stressed rats. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38: 9-10

Sahin E, Gumuslu S, Ozturk O, Abidin I, Yargicoglu P, Agar A. Marked changes in erythrocyte antioxidants and lipid peroxidation levels of rats exposed to acute, repeated and chronic restraint stress. *Pharmazie.* 2004a; 59: 961-964.

Sahin E, Gumuslu S. Cold-stress-induced modulation of antioxidant defence: role of stressed conditions in tissue injury followed by protein oxidation and lipid peroxidation. *Int J Biometeorol.* 2004b; 48: 165-171.

Salim AS. The permissive role of oxygen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat. A new theory for carcinogenesis. *Int J Cancer.* 1993; 53: 1031-1035.

Scaiano JC. Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions and magnetic field effects in melatonin chemistry. *J Pineal Res.* 1995; 19: 189-195.

Selvam R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urol Res.* 2002; 30: 35-47.

Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol.* 1995; 79: 675-686.

Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Rep.* 2004; 9: 145-152.

Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, Sempore B, Lavoie JM, Favier R. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35: 24-32.

Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P. Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J Free Radic Biol Med.* 1985; 1: 117-124.

Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry.* 1993; 215: 213-219.

Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol.* 2000; 3: 229-235.

Srigiridhar K, Nair KM. Supplementation with alpha-tocopherol or a combination of alpha-tocopherol and ascorbic acid protects the gastrointestinal tract of iron-deficient rats against iron induced oxidative damage during iron repletion. *Br J Nutr.* 2000; 84: 165-173.

Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62: 797-821.

- Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta*. 1984; 779: 89-137.
- Tamaki T, Uchiyama S, Nakano S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc*. 1992; 24: 881–886.
- Tandon R, Khanna HD, Dorababu M, Goel RK. Oxidative stress and antioxidants status in peptic ulcer and gastric carcinoma. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2004; 48: 115-118.
- Tauler P, Aguiló A, Guix P, Jiménez F, Villa G, Tur JA, Córdova A, Pons A. Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. *J Sports Sci*. 2005; 23: 5-13.
- Terblanche SE, Gohil K, Packer L, Henderson S, Brooks GA. The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001; 128: 889-896.
- Thomas C, Perrey S, Ben Saad H, Delage M, Dupuy AM, Cristol JP, Mercier J. Effects of a supplementation during exercise and recovery. *Int J Sports Med*. 2007; 28: 703-12.
- Tkeshelashvili LK, McBride T, Spence K, Loeb LA. Mutation spectrum of copper-induced DNA damage. *J Biol Chem*. 1991; 266: 6401-6402.
- Torres RL, Torres IL, Gamaro GD, Fontella FU, Silveira PP, Moreira JS, Lacerda M, Amoretti JR, Rech D, Dalmaz C, Bello AA. Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 185-192.
- Trneckova L, Sida P, Hynie S, Krejci I, Hlinak Z, Klenerova V. Effects of two types of restraint stress on the spontaneous behaviour in rats. *Acta Medica*. 2004; 47: 177-180.
- Urhausen A, Kindermann W. Diagnosis of overtraining: what tools do we have? *Sports Med*. 2002; 32: 95-102.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 44-84.

Venditti P, De Rosa R, Caldarone G, Di Meo S. Functional and biochemical characteristics of mitochondrial fractions from rat liver in cold-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61: 3104-3116.

Walling C. The nature of the primary oxidants in oxidations mediated by metal ions. King TE, Mason HS, Morrison M. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Oxidases and Related Redox Systems* Pergamon Press. 1982; 85-97.

Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989; 320: 365-376.

Williams MH. Vitamin supplementation and athletic performance. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.* 1989; 30: 163-191.

Yaspelkis BB, Singh MK, Trevino B, Krisan AD, Collins DE. Resistance training increases glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 2002; 175: 315-23.

Yu BP. How diet influences the aging process of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994a; 205: 97-105.

Yu BP. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994b; 74: 139-162.

Zaidi SM, Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta.* 2004; 340: 229-233.

Zaidi SM, Al-Qirim TM, Banu N. Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver. *Drugs R D.* 2005; 6: 157-165.