

MÁSTER EN RENDIMIENTO DEPORTIVO Y SALUD



EFECTOS DEL CONSUMO DE PLX[®] EN JUGADORES UNIVERSITARIOS DE FÚTBOL SALA

TRABAJO FIN DE MÁSTER: Curso 2016-2017

CONVOCATORIA: Septiembre

APELLIDOS Y NOMBRE DEL ALUMNO: Beltrá Noriega, David

TUTOR ACADÉMICO: ENRIQUE ROCHE COLLADO

TUTOR PROFESIONAL: NÉSTOR VICENTE SALAR

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	3-11
2.1. Desequilibrio oxidativo y especies reactivas.....	3-4
2.2. Alteraciones oxidativas en macromoléculas biológicas.....	4-6
2.2.1. Hidratos de carbono.....	4
2.2.2. Lípidos.....	4-5
2.2.3. Proteínas.....	5
2.2.4. Ácido desoxirribonucleico (ADN).....	5-6
2.3. Mecanismos de defensa contra el daño oxidativo.....	6-9
2.4. Desequilibrio oxidativo en el deporte.....	9-10
2.5. Desequilibrio oxidativo en el fútbol.....	10-11
3. Objetivo.....	11
4. Materiales y métodos.....	11-16
4.1. Obtención y purificación de células sanguíneas.....	14-15
4.2. Determinación de actividades enzimáticas.....	15
4.3. Marcadores de desequilibrio oxidativo.....	15-16
4.3.1. Malondialdehído (MDA) en linfocitos, plasma y neutrófilos.....	15-16
4.3.2. Determinación de carbonilos proteicos en linfocitos neutrófilos y plasma.....	16
5. Discusión y resultados.....	16
6. Conclusiones.....	17
7. Bibliografía.....	17-20

1. RESUMEN

El deporte es una situación donde el mayor consumo de oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial propicia un aumento del desequilibrio oxidativo. Los radicales libres formados durante este proceso actúan como segundos mensajeros modulando la expresión de genes que codifican para las principales enzimas antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Esta respuesta adaptativa permite contrarrestar el efecto dañino que los radicales libres ejercen sobre las macromoléculas biológicas. Sin embargo, en determinadas situaciones, la intensidad del ejercicio sobrepasa la capacidad de las defensas antioxidantes. Esto ocurre durante la competición o en situaciones de sobre-entrenamiento. En estos casos, la toma de antioxidantes exógenos resulta recomendable, con la intención de aumentar el poder antioxidante del organismo. Nuestro grupo ha trabajado con extractos de hierbaluisa (*Lippia citriodora*) que contienen abundantes compuestos polifenólicos. La eficacia antioxidante de estos extractos ha sido probada en deportes de resistencia y de fuerza. El objetivo del presente trabajo es probar la eficacia de este extracto vegetal en un deporte interválico, como es el fútbol sala.

2.INTRODUCCIÓN

2.1. Desequilibrio oxidativo y especies reactivas

Los seres humanos necesitan oxígeno para mantener las funciones vitales. Sin embargo, el oxígeno es uno de los elementos más reactivos que existe, capaz de alterar macromoléculas a través de intermediarios denominados Especies Reactivas del Oxígeno (ERO). Por otra parte, el nitrógeno también puede generar estas sustancias (ERN) (Cheeseman & Slater, 1993; Roche & Romero-Alvira, 1997). El conjunto de todas ellas se conoce como Especies Reactivas del Oxígeno y del Nitrógeno (ERON). Como se verá más adelante, estas especies son, por regla general, radicales libres, es decir, moléculas con un electrón desapareado, lo que las convierte en sustancias muy reactivas y con una vida media muy corta. Por tanto, no es de extrañar que la mitocondria sea el generador más importante de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON) ya que, en los mamíferos, más del 90% del oxígeno es consumido por la cadena respiratoria mitocondrial. En este contexto, el oxígeno actúa como último aceptor de electrones generando una sustancia inocua: agua. Cuando uno de los electrones que fluye por la cadena respiratoria se deslocaliza, aparecen las ERON.

Un exceso incontrolado de estas ERON rompe el equilibrio redox de la célula produciendo “desequilibrio o estrés oxidativo“ y superando la capacidad de defensa antioxidante endógena. Tal situación puede darse durante o después de exponerse a situaciones de hipoxia, de ejercicio intenso, isquemia o bien situaciones patológicas. Sin embargo, un exceso de producción de éstas ERON, también puede ser debido a la exposición de agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz

ultravioleta, contaminación ambiental, humo de tabaco y consumo excesivo de alcohol (Veiga et al., 1997). Las ERON incluyen tanto especies radicales como no radicales. En átomos y moléculas los electrones ocupan regiones conocidas como orbitales. La mayoría de moléculas no son radicales debido a que contienen sus electrones apareados. Por el contrario, si en un orbital existe sólo un electrón, éste se encontrará desapareado y por tanto formará un radical libre (Halliwell, 1995).

Los radicales libres son moléculas inestables, altamente reactivas que se generan tanto en el organismo, como fuera de él. Su alta reactividad hace que reaccionen con las moléculas que tienen más cercanas como proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos. Esto provoca cambios en la estructura de estas macromoléculas, alterando su función dentro o fuera de la célula. Una acumulación excesiva de moléculas oxidadas genera una situación de desequilibrio oxidativo, ya que éstas son a su vez una fuente generadora de más radicales libres.

2.2. Alteraciones oxidativas en macromoléculas biológicas.

Los radicales libres se forman continuamente en el organismo como subproductos normales del metabolismo. Estos radicales libres participan en diversos procesos, como la defensa contra agentes intrusos tales como bacterias y virus. Sin embargo, fuera de este contexto los radicales libres pueden provocar daños celulares si reaccionan con moléculas esenciales tales como el ADN (portador de la información genética), lípidos de membranas, hidratos de carbono y proteínas.

2.2.1 Hidratos de carbono

Respecto a los hidratos de carbono, éstos reaccionan fácilmente con el radical hidroxilo (OH^\bullet) llegando a producir radicales tipo peroxilo (ROO^\bullet) los cuales ocasionan rupturas en la propia molécula afectada y en las cadenas de las moléculas adyacentes (Thomas, 1994).

2.2.2 Lípidos

En lo que concierne a los lípidos, los más susceptibles a sufrir alteraciones tipo oxidativo son los lípidos ingeridos por la dieta y los lípidos de membrana. La peroxidación lipídica o degradación oxidativa de los lípidos, es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas biológicas. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena. En la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que contienen múltiples dobles enlaces entre los cuales se intercalan grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) que poseen hidrógenos particularmente reactivos. Al igual que cualquier reacción con radicales, esta consiste en tres pasos fundamentales: iniciación, propagación y terminación:

- En la iniciación, un radical reacciona sobre una molécula lipídica (R) resultando un nuevo radical (R^\bullet).

- En la fase de propagación, el radical formado (R^\bullet) reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando radicales peroxilo (ROO^\bullet). Debido a la inestabilidad del peroxilo, éste reacciona con otras moléculas dando lugar a nuevos radicales orgánicos (R^\bullet) y peróxidos lipídicos ($ROOH$). Este ciclo continúa ya que el nuevo radical (R^\bullet) se comporta de la misma manera. Cuando un radical reacciona, siempre produce otro radical, es por ello que se trata de un mecanismo de reacción en cadena.
- La fase de terminación es la fase terminal del proceso y se produce cuando dos radicales reaccionen y produzcan una especie estable. Esto ocurrirá solamente cuando la concentración de especies radicales sea lo suficientemente alta como para que exista la probabilidad de que se encuentren dos radicales. También se producirá cuando actúen antioxidantes que intercepten la cadena de peroxidación.

2.2.3 Proteínas

La exposición de proteínas a radicales produce cambios dramáticos en su estructura, afectando por lo tanto a su función biológica. Aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina son más susceptibles de sufrir alteraciones oxidativas. Además, se establecen entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos.

2.2.4 Ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN mitocondrial codifica 13 proteínas involucradas en la producción de energía celular y procesos de fosforilación oxidativa. Por lo tanto, el entorno que rodea la mitocondria y el ADN mitocondrial está expuesto al daño oxidativo producido por los radicales libres generados por su metabolismo. Por otra parte, el material genético de las mitocondrias no está protegido por histonas como lo está el ADN nuclear, y que los mecanismos de reparación de daños en el ADN son poco eficientes en las mitocondrias. Debido a esta desprotección, el ADN mitocondrial sufre el número más elevado de mutaciones, en comparación con el ADN nuclear (Wallace, 1994).

Respecto al ADN nuclear, las alteraciones de tipo oxidativo producen mutaciones en éste, modificando sus bases. Se conoce que el daño al ADN por radicales libres endógenos ocurre de forma espontánea, por lo que existe un nivel habitual de bases modificadas por ERO en este ADN (Shi et al., 1996). La acción del OH^\bullet da lugar a más de 20 modificaciones y entre ellas la más frecuente es la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) que tiene un potencial altamente mutagénico al igual que la 5-hidroximetil-2-desoxiuridina. (Reid et al., 1991) La guanina es particularmente susceptible a los efectos de los radicales libres en la posición C8. El radical del hidroxilo y el oxígeno singlete son los principales responsables de la modificación oxidativa de la guanina a 8-hidroxiguanina. Numerosos estudios han demostrado que el potencial mutagénico de la 8-hidroxiguanina resulta de la capacidad

de interrumpir el proceso de replicación del ADN (Kasai, 2002), apareándose de forma incorrecta en la cadena complementaria con adenina en lugar de citosina.

2.3 Mecanismos de defensa contra el daño oxidativo

Hasta la actualidad, los antioxidantes han sido considerados una estrategia nutricional para prevenir o minimizar los efectos perjudiciales de ERON, que se generan durante y después del ejercicio extenuante (Jackson, 2008). Un estado óptimo de salud requiere el control de la producción de ERON por parte del organismo. Así, la producción de radicales libres puede tener un propósito útil. El ejemplo es la producción de ERON en los procesos inflamatorios por parte de las células circulantes, como los neutrófilos. Sin embargo, existen numerosas situaciones patológicas en las que las ERON se producen en exceso, provocando un importante daño oxidativo. Para reducir los posibles efectos negativos, el organismo dispone de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y proteínas fijadoras de metales, entre otros, que actúan, minimizando la formación de ERON, reparando las macromoléculas alteradas (ADN o lípidos) o degradando sustratos oxidados, como por ejemplo proteínas. Los antioxidantes pueden ser definidos como “sustancias que son capaces, a concentraciones relativamente bajas, de neutralizar las ERON y de esta manera, inhibir o retardar significativamente la oxidación de dichos sustratos” (Halliwell & Gutteridge, 1986).

Las enzimas antioxidantes trabajan en conjunto para eliminar de manera coordinada los radicales libres intracelulares (Roche & Romero-Alvira, 1997). Los principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT).

Superóxido dismutasa (SOD): Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas que contienen metales en su centro activo, encontrándose en el citosol (Cu-Zn-SOD) y en la matriz mitocondrial (Mn-SOD). Estas enzimas dismutan el anión superóxido formando peróxido de hidrógeno (Céspedes & Ela, 1996).

La catalasa (CAT) tiene una amplia distribución en el organismo, encontrándose a alta concentración en hígado y riñón, y a baja concentración en tejido conectivo y epitelios, siendo prácticamente nula en tejido nervioso. Se localiza a nivel intracelular en varios orgánulos, aunque preferentemente en peroxisomas. Su función fundamental es la eliminación del peróxido de hidrógeno producido a nivel de la SOD (Céspedes & Ela, 1996)

Glutatión peroxidasa (GPX): Es una enzima selenio-dependiente, cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua, utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH). Se localiza en el citosol (eritrocitos) y minoritariamente en lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune). Esta enzima también cataliza la eliminación de lipoperóxidos. Existen 3 formas de GPX: GPX-c o forma celular que tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que

por lipoperóxidos, GPX-p o forma extracelular, que presenta afinidad semejante para ambos sustratos y GPX-ph con afinidad específica para los lipoperóxidos (Céspedes & Ela, 1996). Actualmente, se han descrito 5 isoformas de este enzima (GPX1-GPX5) que catalizan la misma reacción pero varían en la especificidad del sustrato (Kaynar et al., 2005). El glutatión oxidado es recuperado por la glutatión reductasa (GRD) que coordina su actividad con la GPX.

El sistema antioxidante GPX/GRD está a su vez coordinado con el sistema antioxidante SOD/CAT. Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par. La CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 , mientras que la GPX actuaría a bajas concentraciones. Por tanto, las actividades CAT y GPX estarían inversamente correlacionadas (Cisneros, 1995).

Respecto a los antioxidantes no enzimáticos, éstos ayudan al mantenimiento del equilibrio redox del organismo y pueden ser **endógenos** o **exógenos**. El antioxidante no enzimático endógeno más destacable es el glutatión, que existe principalmente en su forma reducida (GSH) y que es usado por el sistema antioxidante antes mencionado GPX/GRD. La glutatión reductasa es una flavoenzima cuyo coenzima es el dinucleótido fosforilado de nicotinamina-adenina reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), el cual será utilizado por la GPX para la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de lipoperóxidos (L-OOH) (Cisneros, 1995). El GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol) tras participar en la eliminación de radicales libres (Ji, 1999), El coenzima Q10 (ubiquinol) es otro antioxidante que en su forma reducida reacciona con radicales libres y con el oxígeno singlete previniendo la peroxidación lipídica (Voet & Voet, 1990).

Por otro lado, el ácido úrico neutraliza radicales peroxilo e hidroxilo y a su vez, es capaz de quelar iones metálicos como el hierro y cobre, evitando la aparición de radicales por reacciones de tipo Fenton (Powers & Jackson, 2008). En este contexto, la bilirrubina, que posee un fuerte potencial antioxidante contra radicales ROO^\bullet y H_2O_2 , se transforma al ser oxidada en biliverdina y es reciclada a bilirrubina vía biliverdina reductasa (Baranano *et al.*, 2002). Finalmente, la transferrina y ferritina (captadoras de hierro) y la ceruloplasmina (transportadora de cobre), son proteínas que secuestran posibles agentes prooxidantes como son los metales de transición hierro y cobre, motivo por el cual se les considera dentro de los sistemas de defensa antioxidante (Powers & Sen, 2000).

En cuanto a los antioxidantes no enzimáticos exógenos (incorporados a través de la dieta), se encuentran algunas vitaminas y minerales. La vitamina C presenta una configuración de lactona, en la que los grupos hidroxilos asociados al doble enlace funcionan como agentes con alto potencial reductor, lo que le permite, participar en la reducción directa del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas (Mayes, 1997).

La vitamina E hace referencia a un grupo de compuestos liposolubles que incluyen cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles (denominados α -, β -, γ - y δ -). Aunque todos estos son isómeros de la vitamina E naturales, así como también lo es el rac- α -tocoferol sintético, tienen actividades antioxidantes relativamente similares, el α -tocoferol (en su forma natural también llamada RRR- α -tocoferol) es la forma biológicamente más activa de la vitamina E. Dicha vitamina fue descubierta hace más de 90 años como un micronutriente necesario para el desarrollo fetal en ratas (Evans & Bishop, 1922). Una de las principales funciones de la vitamina E es su papel como un antioxidante liposoluble (Halliwell & Gutteridge, 2007). Además, como depurador potente de los radicales peroxilo, la vitamina E es el principal inhibidor de la reacción en cadena mediada por radicales libres de la peroxidación lipídica en mamíferos, incluyendo humanos (Halliwell & Gutteridge, 2007). El radical tocoferoxilo, que resulta de la reacción de α -tocoferol con radicales peroxilo, puede ser "reciclado" a su forma activa de vitamina E por otros antioxidantes como la vitamina C o el glutatión (Traber, 2007). La importancia de esta función es mantener la integridad de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en las membranas celulares de todo el organismo y, de este modo, mantener su estructura y función biológica (Traber & Atkinson, 2007).

Por otro lado, se considera que la vitamina E juega un papel clave en la prevención de la aterosclerosis y otras enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Brigelius et al. 2002). Recientemente, también se ha demostrado que la vitamina E está implicada en la regulación de la transcripción, la liberación de ácido araquidónico (un ácido graso poliinsaturado de cadena larga y precursor de eicosanoides, que modulan la inflamación) y vías de señalización celular en las que participa la proteína quinasa C (que regula la proliferación celular y la apoptosis) (Brigelius et al., 2002; Traber & Atkinson, 2007). Sin embargo, existe un debate en curso sobre si estas funciones se deben realmente al funcionamiento adicional (es decir, no antioxidante) de la vitamina E como molécula de señalización (Brigelius et al., 2002) o más bien relacionadas con su función antioxidante y de protección de la membrana (Traber & Atkinson, 2007). Por tanto, las vitaminas C y E, así como la A, se clasifican como *antioxidantes interruptores*, porque actúan interrumpiendo la reacción en cadena de formación de radicales libres, atrapándolos y reduciéndolos, a diferencia de los *antioxidantes preventivos* (entre los que se encuentran las enzimas peroxidasas), que evitan la iniciación de la secuencia de reacciones en cadena (Shite et al., 2001).

Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde actúan.

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas

Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-diaforasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

(Reitter, 1995)

Clasificación de los antioxidantes, según su función en el organismo.

Origen	Características
1. Exógenos	Acción
Vitamina E	- Neutraliza el oxígeno singlete
	- Captura radicales libres hidroxilo
	- Captura O ₂
	- Neutraliza peróxidos
Vitamina C	- Neutraliza el oxígeno singlete
	- Captura radicales libres de hidroxilo
Vitamina C	- Captura O ₂
	- Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Betacarotenos	Neutraliza el oxígeno singlete
Flavonoides, Licopenos	
2. Endógenos	
Enzimáticos	Cofactor
Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, cinc, manganeso
Catalasa (CAT)	Hierro
Glutación peroxidasa (GPx)	Selenio
3. No enzimáticos	Modo de acción
Glutación	Actúa como barrera fisiológica controlando la acción del oxígeno desde su incorporación hasta las células
Coenzima Q	Cadena de transporte electrónica mitocondrial
Transferrina y ceruloplasmina	Transportadores de metales

(Reitter, 1995)

2.4 Desequilibrio oxidativo en el deporte

La práctica del ejercicio físico de intensidad moderada aporta efectos beneficiosos al organismo. Sin embargo, la práctica de episodios de ejercicio físico exhaustivo es una de las situaciones que genera desequilibrio oxidativo, incrementando la formación de ERON (Fisher-

Wellman & Bloomer, 2009). Por otro lado, diferentes estudios han establecido que, tanto el ejercicio supramáximo y de corta duración, como el ejercicio submáximo debido a la exposición a ambientes extremos: como apnea en buceo, o la hipoxia en grandes alturas (donde la PO₂ se encuentra disminuida), generan desequilibrio oxidativo (Groussard *et al.*, 2003). Generalmente, a medida que avanza la competición, el nivel de intensidad de los entrenamientos aumenta con el fin de conseguir un buen resultado a final de temporada. Este aumento de la intensidad y carga de los entrenamientos son factores que ponen a prueba la defensa antioxidante del deportista, favoreciendo situaciones de desequilibrio oxidativo. Los deportes de tipo aeróbico extensivo como el ciclismo y el triatlón, o los interválicos con picos de intensidad máxima, como el fútbol y el tenis, son los que generan más situaciones de desequilibrio oxidativo (Powers, et al., 1999).

2.5 Desequilibrio oxidativo en el fútbol

El fútbol es un deporte muy exigente que requiere que los jugadores corran hasta 10 incluso 12 km por partido (en el caso de los extremos), incluyendo muchas acciones a alta intensidad, sprints y cambios de dirección. El éxito depende de las habilidades técnicas, tácticas y físicas de los jugadores. Sin embargo, la nutrición es uno de los factores más importantes que influyen en el rendimiento de los jugadores. En los partidos se produce un gran desgaste físico que está causado por varios factores, siendo los principales la duración y la intensidad del partido.

Anteriormente ya se ha mencionado que la práctica de episodios de ejercicio físico exhaustivo es una de las situaciones que genera desequilibrio oxidativo (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). Esta situación se da en el fútbol profesional, y especialmente en partidos clave como son las finales de campeonatos importantes (Champions League, UEFA, copas Nacionales, Mundial y torneo europeo).

Se ha demostrado que los jugadores de fútbol que además de entrenar regularmente, participan en la mayoría de partidos de liga y copa de la temporada, alcanzan niveles más altos de daño por estrés oxidativo, a pesar de un aumento en la capacidad antioxidante endógena. Por lo tanto, la suplementación con vitaminas antioxidantes podría ser una herramienta útil para evitar los daños por estrés oxidativo en este tipo de deportistas (Brites, et al., 1999). Sin embargo, a pesar de que suplementos como las vitaminas C y E pueden tener un efecto beneficioso modesto para los futbolistas de élite al actuar como antioxidantes, no tienen un efecto ergogénico directo en el rendimiento físico (Thompson, et al., 2001).

Durante el ejercicio, las ERO producidas por el músculo esquelético contribuyen a desarrollar adaptaciones necesarias para el incremento de la fuerza y combatir la fatiga. Bajos niveles de ERO producidas durante los entrenamientos actuarían como segundos mensajeros, favoreciendo la inducción de los genes que codifican las enzimas antioxidantes (Powers, Jackson, 2008). Sin embargo,

niveles muy elevados típicos de la competición ejercerían un efecto contrario, generando fatiga y requiriendo la suplementación con antioxidantes exógenos. Además, los niveles elevados de ERON también estarían estrechamente asociados con situaciones de sobre-entrenamiento. El ejercicio físico regular a largo plazo aumenta inmediatamente la respuesta inmune adaptativa, mientras que el ejercicio intermitente de alta intensidad disminuye la respuesta inmune adaptativa, favoreciendo la aparición de una cantidad de ERON que supera la capacidad antioxidante de las defensas del organismo. (Kwak et al., 2000; Walsh et al., 2011). Por lo tanto, mantener un estado redox óptimo es de fundamental importancia para la adaptación muscular y, por tanto, para el rendimiento durante toda la temporada.

Además de la generación de ERON por un excesivo metabolismo mitocondrial, existen otras situaciones que también propician la generación de ERON, como sería el caso de los microtraumatismos producidos por contacto, muy habituales también en el fútbol. Dichos microtraumatismos activarían procesos inflamatorios donde enzimas como la NADPH-oxidasa y la mieloperoxidasa de los neutrófilos producirían daño oxidativo.

3. OBJETIVO

Los suplementos antioxidantes son importantes en la recuperación deportiva tras la realización de ejercicio de elevada intensidad. En estas situaciones, los antioxidantes endógenos no pueden acometer la defensa contra las especies reactivas del oxígeno generadas. El PLX[®] es un extracto de hierbaluisa (*Limpia citriodora*) desarrollado por la empresa Monteloeder y validado científicamente por la Universidad Miguel Hernández. Los polifenoles son los antioxidantes predominantes en el extracto y su eficacia ha sido probada en la recuperación tras ejercicios de resistencia (Carrera-Quintanar et al. 2012a, 2012b) y de fuerza (Carrera-Quintanar et al., 2015). El extracto no ha sido probado en la recuperación tras ejercicios interválicos. Por tanto, el objetivo del presente TFM es:

- Investigar acerca de los efectos antioxidantes del consumo de **PLX[®]**, durante 21 días, mediante el análisis de las enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo, en células circulantes y plasma de jugadores de fútbol sala de la liga universitaria que realizan actividad física intermitente de forma moderada.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández y de la Universidad de las Islas Baleares aprobó el protocolo de ensayo de este estudio, en cumplimiento de la normativa establecida (ley 14/2007). Para este estudio se seleccionaron 89 individuos varones, estudiantes de 2º curso de la Licenciatura de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte, los cuales contaban con un seguro médico, dando su consentimiento informado por escrito.

Parámetros de inclusión:

- Jugadores de fútbol sala universitarios (varones)
- Ausencia de enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, síndrome metabólico, etc).

Parámetros de exclusión:

- Consumo de suplementos nutricionales (antioxidantes, vitaminas, minerales, extractos vegetales, etc).
- Uso de medicación antiinflamatoria
- Tener cualquier tipo de lesión crónica o severa.

Con la intención de que el estudio se aplicara en las mismas condiciones a todos los sujetos, se homogenizó el nivel de entrenamiento de los participantes y la dieta. Gracias a esta homogenización, se descartó la posibilidad de que el desequilibrio oxidativo estuviese causado por un entrenamiento inadecuado o una dieta desequilibrada. Las dietas eran controladas mediante reuniones con los sujetos. Para que los sujetos se familiarizaran a la nueva dieta, los deportistas empezaron con ésta 20 días antes del comienzo del periodo de suplementación de 21 días. Para el diseño de las dietas, las cuales eran de 2.500 kcal, se utilizó el programa informático Dietsource de Novartis. Las dietas contenían un 60% de hidratos de carbono, 12% de proteínas y 28% de lípidos.

El grupo suplementado con PLX[®] consumió 3 cápsulas de PLX[®] (*Lippia citriodora* conteniendo 10% verbascósido) por día (600 mg de PLX[®]/cápsula, total 1800 mg/día), mientras que el grupo placebo no consumía suplemento.

Los individuos realizaron 5 partidos de fútbol sala, 1 al inicio del estudio, 1 al final y en el periodo transcurrido entre ambos partidos, los sujetos jugaron 3 partidos más, (éstos, oficiales de liga universitaria regional) y tuvieron 2 entrenamientos semanales.

Las extracciones se realizaron en ayunas el día de después de los partidos que se jugaron al inicio y final del estudio y fueron tomadas de la vena antecubital entre las 09:00 y 11:00 h. En cada una de las muestras sanguíneas se realizó una analítica de rutina de acuerdo a los protocolos establecidos en los laboratorios de análisis clínicos que se describe con valores normales en las tablas 1, 2 y 3. La sangre sobrante (20 ml aproximadamente), se transportó en frío a los laboratorios de la Universidad Miguel Hernández para realizar el resto de las determinaciones a continuación descritas.

Tabla 1: Hematología.

Determinación	Valores de referencia	Unidades
<i>Hemograma</i>		
Serie Roja		
• Hematíes	4.600.000 - 6.000.000	/μl
• Hemoglobina	13 - 16,5	g/dl
• Valor Hematocrito	40 - 54	%
V.C.M	80 - 95	fl
H.C.M	26.5 - 33.5	pg
C.H.C.M	31.5 - 35	g/dl
RDW-SD	37 - 56	fl
• Plaquetas	150,000 - 450,000	/μl
Serie Blanca		
• Leucocitos	4,500 - 10,000	/μl
Fórmula Leucocitaria		
• Segmentados	2,500 - 7,500	/μl
• Cayados	10 - 300	/μl
• Eosinófilos	50 - 500	/μl
• Basófilos	10 - 150	/μl
• Monocitos	200 - 800	/μl
• Linfocitos	1,500 - 4,500	/μl

V.C.M.: volumen corpuscular medio.

H.C.M.: hemoglobina corpuscular media.

C.H.C.M.: concentración de hemoglobina corpuscular media.

RDW: banda de distribución de hematíes (red cell distribution).

**Valores proporcionados por el laboratorio encargado de las extracciones*

Tabla 2: bioquímica de sangre.

Determinación	Valores de referencia	Unidades
Glucosa	70 - 110	mg/dl
Creatinina	Hasta 1,40	mg/dl
Urea	20 - 50	mg/dl
Ácido Úrico	3,4 - 7,0	mg/dl
GGT	Hasta 55	U/l
GOT	Hasta 40	U/l
GPT	Hasta 40	U/l
FA	Entre 80 - 306	U/l
CK	Hasta 195	U/l
Hierro sérico	70 - 160	μg/dl
Ferritina	70 - 435	ng/ml
Mgb (método turbidimetría)	Hasta 65	ng/ml
Sodio (método ISE)	135 - 146	mEq/l
Potasio (método ISE)	3,5 - 5,1	mEq/l
Lactato (método enzimático)	4,5 - 19,8	mg/dl

**Valores proporcionados por el laboratorio encargado de las extracciones*

Tabla 3: perfil lipídico.

Determinación	Valores de referencia	Unidades
Triglicéridos	Hasta 175	mg/dl
Colesterol total	Riesgo deseable: inferior 200 Riesgo intermedio: entre 200 – 240 Riesgo alto: superior a 240	mg/dl
HDL-Colesterol	Riesgo deseable: superior a 45 Riesgo intermedio: entre 40 y 45. Riesgo alto: inferior a 40	mg/dl
IR	Riesgo deseable: índice inferior a 4 Riesgo intermedio: índice entre 4 y 4.5 Riesgo alto: índice superior a 4.5	
LDL	Persona con riesgo alto < 100 Persona con 2 ó más factores de riesgo < 130 Persona con 0 ó 1 factores de riesgo < 160	mg/dl

Nota: Valor de Col-LDL se obtiene mediante la fórmula de Friedewald. Cuando los TG superan los 200 el valor que se obtiene no es significativo.

**Valores proporcionados por el laboratorio encargado de las extracciones*

4.1. Obtención y purificación de células sanguíneas.

La obtención de las diferentes fracciones celulares se realizó siguiendo una modificación del método de Boyum (Boyum, 1964). La sangre se depositó cuidadosamente por las paredes de un tubo Corning, sobre un volumen de ficoll, en una proporción ficoll:sangre de 1:1,5 (4ml:6ml). La muestra se centrifugó a 900xg durante 30 min a 18°C. Como resultado se obtuvo la siguiente distribución celular: la fase inferior formada por los neutrófilos y eritrocitos, la fase intermedia de ficoll conteniendo linfocitos y la fase superior correspondiente al plasma.

Para la obtención de los **linfocitos** se recogió cuidadosamente con pipetas Pasteur la capa de los mismos obtenida en la primera centrifugación. Esta suspensión celular se lavó de los restos de ficoll y plasma con 10 ml de PBS y se centrifugó a 900xg durante 10 min a 4°C. El precipitado celular obtenido fue lisado con 2 ml de agua bidestilada para medir actividades enzimáticas, MDA y carbonilos. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Los **neutrófilos** fueron obtenidos de la fase intermedia de la primera centrifugación. Para ello se retiraron las fases inferiores recuperando los neutrófilos y eritrocitos. Los eritrocitos fueron hemolizados añadiendo 50 ml de 0,15 M CINH₄ en un baño de agua/hielo durante 30-60 min. Una vez producida la hemólisis se centrifugó la suspensión celular a 750xg durante 10 min a 4°C. Posteriormente se repitió el mismo tratamiento con el CINH₄ y en las condiciones de centrifugación anteriores.

Finalmente, el precipitado celular se lavó con 15 ml de PBS y se centrifugó en las mismas condiciones. Los neutrófilos se lisaron en un volumen de 2 ml de agua bidestilada para medir actividades enzimáticas, MDA y carbonilos. Las alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Para **eritrocitos y plasma**, se utilizó un tubo nuevo de sangre con EDTA, se centrifugaron las muestras a $1000\times g$ durante 30 min a 4°C . Se recogió el sobrenadante (plasma) para medir MDA y carbonilos y se almacenó a -80°C hasta su uso. Los eritrocitos obtenidos en el precipitado se lavaron con 10 ml de PBS. Para eliminar los neutrófilos y linfocitos, los eritrocitos se resuspendieron por inversión y se dejaron en hielo unos minutos y se centrifugaron a $1000\times g$ durante 30 min a 4°C . Posteriormente el precipitado celular se resuspendió con un volumen de agua bidestilada equivalente al del plasma original, se alicuotó para medir actividades enzimáticas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.2. Determinación de actividades enzimáticas.

Las actividades de las enzimas antioxidantes se realizaron por un método automatizado en un lector de microplacas SPBC-TROstar, Omega, BMG LabTech GmbH, Offenburg (Alemania) conforme al protocolo descrito por (Carrera-Quintanar et al., 2012).

4.3. Marcadores de desequilibrio oxidativo.

4.3.1. MDA (en linfocitos, plasma y neutrófilos).

Respecto a la peroxidación lipídica, se determinó mediante la cuantificación del principal producto final de oxidación de los fosfolípidos que es el malondialdehído (MDA), el cual a altas temperaturas y en condiciones ácidas reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA), que es un compuesto orgánico de naturaleza heterocíclica, formando un complejo que puede ser detectado y cuantificado mediante fluorimetría, o espectrometría.

Para ésto se mezclaron $200\ \mu\text{l}$ en el caso de neutrófilos o linfocitos y $50\ \mu\text{l}$ en el caso del plasma, con $50\ \mu\text{l}$ de $0,05\%$ en etanol de BHT y $50\ \mu\text{l}$ de 20% de TCA en $0,6\ \text{M HCl}$. Las muestras se incubaron 15 min en hielo y se centrifugaron a $5000\times g$ durante 15 min a 4°C . Posteriormente se añadieron $100\ \mu\text{l}$ de $0,6\%$ de TBA en agua, a $100\ \mu\text{l}$ del sobrenadante de la mezcla centrifugada anteriormente. La mezcla se incubó a 97°C durante 1 h. Al terminar la incubación se dejaron enfriar las muestras en hielo durante 10 min. Enseguida se realizó la extracción líquido/líquido del cromógeno TBA-MDA con $300\ \mu\text{l}$ de n-butanol, las muestras se agitaron vigorosamente durante 30 segundos y se centrifugaron a $10000\times g$ durante 3 min. La cuantificación del complejo TBA-MDA se llevó a cabo por HPLC-FL (LaChrom, Merck-Hitachi) equipado con detector de fluorescencia. Se inyectaron $20\ \mu\text{l}$

de cada muestra en una columna de fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 con un flujo isocrático de 1 ml/min de la fase móvil, metanol:fosfato potásico 50 mM (40:60 v/v), pH 6,8. La detección de los compuestos se llevó a cabo mediante fluorescencia excitando a 515 nm y recogiendo la emisión a 553 nm.

La concentración de MDA se calculó a partir de una recta de calibrado realizada con 1,1',3,3'-tetraetoxipropano (TEP) (0-3,2 nmoles) hidrolizado con 1% ácido sulfúrico cuya concentración se obtuvo midiendo la absorbancia a 244 nm ($\epsilon=13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados fueron expresados en $\mu\text{molesMDA}/\text{n}^\circ \text{ células o ml de plasma}$ (Carrera-Quintanar et al., 2012).

4.3.2. Determinación de carbonilos proteicos en linfocitos, neutrófilos y plasma.

El índice de carbonilos es un indicador de la oxidación de proteínas (Levine *et al.*, 1994). Primeramente, las muestras fueron desproteinizadas. A 250 μl de linfocitos y neutrófilos y 150 μl en el caso del plasma, se le agregaron 250 μl de agua y 500 μl de 30% de TCA. Se centrifugaron a 15000xg durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su determinación.

Posteriormente el precipitado de proteínas se resuspendió en 0,5 ml de 10 mM DNPH (disuelto en 2 M de HCl) y se incubaron las muestras a 37°C durante 60 min. Seguidamente las muestras fueron precipitadas con 20% TCA y centrifugadas a 1000xg durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol:etil acetato (1:1) para eliminar el exceso de DNPH. Al precipitado resultante se le añadió 1 ml de 6 M de guanidina (disuelta en 2 mM de tampón fosfato de potasio, pH 2,3) y la suspensión se incubó a 37°C durante 30 min, en el caso del plasma durante 1 h hasta que se disolvió el precipitado totalmente.

Para finalizar, las muestras fueron centrifugadas a 3000xg durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia del sobrenadante a 360 nm. Como blanco para las medidas se usó la solución de guanidina. Para cuantificar los niveles de carbonilos se utilizó el coeficiente de extinción molar de 22000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Lakowicz, J. R. 2006).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En virtud de la Normativa para la realización de Trabajos Fin de Master, se reserva la publicación de los resultados obtenidos durante la realización del presente trabajo para su posterior publicación en una revista científica. No obstante, los resultados serán presentados durante la defensa y exposición de este trabajo, donde el tribunal contará con todos los datos para la evaluación de los objetivos conseguidos.

6. CONCLUSIÓN.

- 1- Los datos obtenidos en las analíticas al inicio y al final del estudio indicaron que el consumo de PLX[®] (extracto de *Lippia citriodora*) así como la rutina de entrenamiento y la dieta no causaron ningún daño ni alteración a los sujetos participantes.
- 2- La toma del suplemento PLX[®] produjo un incremento en la actividad de la enzima glutatión-peroxidasa de los neutrófilos. El resto de enzimas no mostraron cambios significativos con respecto al grupo placebo.
- 3- La toma del suplemento PLX[®] redujo la peroxidación lipídica, mostrando los sujetos que lo consumieron menores niveles de MDA en neutrófilos en comparación con el grupo placebo.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Baranano D. E., Rao M., Ferris C. D., Snyder S. H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99(25), 16093–16098.
- Boyum, A. (1964). Separation of white blood cells. *Nature.*, 204, 793–794.
- Brigelius-Flohe R, Kelly F.J, Salonen J.T, Neuzil J, Zingg J.M, Azzi A. (2002). The European perspective on vitamin E: Current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr.*, 76, 703–716.
- Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG. et al. (1999). Soccer players under regular training showed increased oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin. Sci.*, 96, 381-385.
- Carrera-Quintanar L, F. L.-S.-L. (2015). Effect of polyphenol supplements on redox status of blood cells: a randomized controlled exercise training trial. *European Journal of Nutrition*, 54, 081-1093.
- Carrera-Quintanar L, Funes L, Viudes E, Tur J, Micol V, Roche E, Pons A. (2012). Antioxidant effect of lemon verbena extracts in lymphocytes of university students performing aerobic training program. *Scand J Med Sci Sports*, 22, 454-461.
- Carrera-Quintanar L, Lopez-Fuertes M. Climent V, Herranz-Lopez M, Micol V, Pons A, Sogorb F, Roche E. (2012). Oxidative damage is present in plasma and circulating neutrophils 4 weeks after a high mountain expedition. *European Journal of Applied Physiology*, 112, 2923-2932.
- Céspedes M, Ela M. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar radicales libres. *ev Cubana Inv Biomed*, 15(2), 75-78.

- Cheesman K.H. & Slater T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49, 181-193.
- Cisneros Prego E. (1995). La glutathion reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cubana Inv Biomed*, 14(1).
- Evans H.M, Bishop K.S. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56, 650–651.
- Fisher-Wellman K. & Bloomer R.J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: A 30 year history. *Dynamic Medicine*, 8(1).
- Groussard C., Machefer G., Rannou F., Faure H., Zauhal H., Sergent O., Chevanne M., Cillard J. & Gratas-Delamarche A. (2003). Physical fitness and plasma non enzymatic antioxidant status at res and after a wingate test. *Can J Appl Physiol*, 28, 79-92.
- Halliwell B & Gutteridge J.M.C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine. Some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and*, 246(2), 501-514.
- Halliwell B. (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 54(6), 505-510.
- Halliwell B, Gutteridge J. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford Univ Press*.
- Jackson M.J. (2008). Free radicals generated by contracting muscle: By-products of metabolism or key regulators of muscle function?. *Free Radicals Biology and*, 44(2), 132-141.
- Kasai H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: Formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med*, 33(4), 450–456.
- Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. (2005). Glutathione peroxidase, glutathione-transferase, catalase, Cu – Zn super oxide dismutase activities in erythrocytes of patients with lung cancer. *Cancer Letters*, 227(2), 130-134.
- Kwak YS, Lee SK, Paik IY. (2000). The effects of prolonged exercise on blood lipid levels and immune response in wistar rat. *Korean J Immunol.*, 22, 87–95.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy (3rd ed.)*. New York: Springer.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Schacter E . (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 233, 346-357.

- Mayes PA. (1997). Estructura y función de vitaminas liposolubles. *Bioquímica de Harper. Murray RK, Mayes PA, Granner DK eds. México DF:El Manual Moderno, S. A., 719-720.*
- Powers S.K, Jackson M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.*, 88, 1243–1276.
- Powers S.K. & Sen C.K. (2000). (2000). Physiological antioxidants and exercise training. *Sen C.K., Packer L., Hännien O. (eds). Handbook of Antioxidants and antioxidants in exercise. Elsevier Science B.V., 221-242.*
- Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc*, 31(7), 987-997.
- Reid TM, Fry M, Loeb LA. (1991). Endogenous mutations and cancer. *Princess Takamatse Symp*(22), 224-229.
- Reitter RJ. (1995). Oxidative processes and antioxidative mechanisms. *FASEB J*, 9, 526-533.
- Roche E. & Romero–Alvira D. (1997). Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. *Capítulos I, II, III, IV. ENE Ediciones.*
- Shi X, J. H. (1996). Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and ADN damage. *Oncology*, 106, 27-38.
- Shite J, Qin F, Mao W, Kawai H, Stevens SY. (2001). Antioxidant vitamins attenuate oxidative stress and cardiac dysfunction in tachycardia – induced cardiomiopathy. *J Am College Cardiol*, 38(6), 1734-1740.
- Thomas J.A. (1994). (1994). Oxidative stress, oxidant defense, and dietary constituents. En *Modern Nutrition in Health Disease. 8a ed (Shils ME, Olson JA, Shike M eds)*, 501-152.
- Thompson D, Williams C, McGregor SJ, Nicholas CW, McArdle F, Jackson MJ, Powell JR. (2001). Prolonged vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.*, 11(4), 466-481.
- Traber M.G, Atkinson J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Bio Med.*, 43, 4-15.
- Traber M.G. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.*, 27, 347–362.
- Veiga E., Aguilar J.A., Clavo B. & Llanes L. (1997). Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos*, 22, 201-216.

Voet D. & Voet J.G. (1990). *Eds. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons.*

Wallace D.C. (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci*, *91*, 8739-8746.

Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P. (2011). Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.*, *17*, 6-63.

