



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Resposta inflammatòria i antioxidant a una sessió d'entrenament de natació

Maria Francisca Cabrer Roman

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2015-16

DNI: 41587616M

Treball tutelat per Antoni Sureda Gomila
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball: Exercici, interleucines, espècies reactives d'oxigen, catalasa, NF-k β .

Índex

Resum	1
Abstract	1
Introducció	2
Inflamació	3
Citocines	4
Especies reactives d'oxigen	6
Efectes positius i negatius de l'exercici	8
Objectiu	10
Material i mètodes	10
Participants i protocols	10
Procediment experimental	11
Dades antropomètriques	12
L'expressió gènica d'ARNm	12
Quantificació de Interleucines	13
Anàlisi estadístic	14
Resultats	14
Determinació de l'expressió de la COX-2, NF- κ B, IL-1 β , IL-10, IL-6 i CAT ..	14
Determinació de les interleucines mitjançant ELISA	15
Discussió	16
Estudi en cèl·lules mononucleades després de l'exercici	16
Concentració de citocines en plasma després de l'exercici	20
Conclusió	22
Bibliografia	22

RESUM

La natació és un exercici aeròbic que requereix un subministrament constant d'oxigen als músculs. A més, es produeixen períodes de hipòxia mentre es té el cap dins l'aigua. Tot això pot induir un notable augment de la producció d'espècies reactives d'oxigen. Aquest marcat augment, s'ha de combatre mitjançant un augment de la capacitat antioxidant del cos, amb una major expressió dels enzims antioxidants com la superòxid dismutasa, la glutatió peroxidasa o la catalasa.

La natació provoca també inflamació derivada de les microruptures associades a la pròpia contracció dels músculs. Com a conseqüència, hi ha una major vasodilatació i permeabilitat dels vasos sanguinis, el que s'aconsegueix per l'augment de prostaglandines, òxid nítric i histamina. A més, augmenten varis paràmetres relacionats amb aquesta com són les interleucines proinflamatòries TNF- α i IL-1 β , i quimiocines, que permeten una major captació de cèl·lules immunitàries cap al teixit danyat per tal de reparar-lo. Finalment, també hi ha una marcada resposta antiinflamatòria promoguda per la IL-6 que augmenta l'expressió de IL-10 i IL-1ra. Aquesta resposta s'activa en l'exercici, a diferència del que passa en una situació de sèpsia, per tal de evitar una resposta inflamatòria molt elevada.

En aquest treball s'han determinat alguns dels paràmetres comentats per tal de demostrar la resposta del cos enfront a una sessió d'exercici físic. En l'estudi han participat 14 nedadores adolescents que estaven bastant entrenades i se'ls ha fet fer una sessió de natació de 30 minuts d'escalfament i 30 minuts nedant més intensament. Les hi feren uns anàlisis abans i 1 hora després de l'esport per tal de determinar els paràmetres bioquímics a plasma i a cèl·lules immunitàries monocucleades. A plasma s'han avaluat per mitjà d'ELISA els nivells de les citocines antiinflamatòries IL-1ra, IL-6 i IL-10, mentre que a nivell cel·lular s'han determinat per PCR a temps real l'expressió de IL-6, IL-10, IL-1 β , la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la catalasa i el factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$). Els resultats indiquen que l'exercici físic augmenta les concentracions plasmàtiques de IL-1ra, IL-10 i IL-6, a més d'incrementar l'expressió de la catalasa, NF- $\kappa\beta$, la COX-2, IL-6, IL-10 i IL-1 β en les cèl·lules mononucleades. En conclusió la pràctica d'exercici induïx una situació transitòria d'inflamació necessària per la recuperació muscular post-exercici i afavoreix l'activació de mecanismes d'adaptació. Es recomanable realitzar esport de manera regular per tal d'adaptar el cos a aquest i poder evitar efectes secundaris perjudicials. A més, la pràctica de natació és un esport interessant ja que el cos rep poc impacte amb la superfície.

ABSTRACT

Swimming is an aerobic exercise that requires a constant supply of oxygen to the muscles. Furthermore, there are periods of hypoxia while keeping the head into the water. This can induce a significant increase in the production of reactive oxygen species. This increased production is counteracted by increasing the body's antioxidant capacity, with increased expression of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase.

Swimming also causes inflammation associated to micro breakages derived from the contraction of the muscles. As a result, there is a greater vasodilation and

permeability of blood vessels, which is achieved due to the increased levels of prostaglandins, nitric oxide and histamine. In addition, there are also raises in several related parameters, such as pro-inflammatory interleukins TNF- α and IL-1 β , and chemokines, which allow a greater recruitment of immune cells to the damaged tissue in order to repair it. Finally, there is a marked anti-inflammatory response promoted by IL-6, which in turn, increases the expression of IL-10 and IL-1ra. This response is triggered by exercise, unlike what happens in a situation of sepsis, in order to avoid a high inflammatory response.

In the present study, some of the above mentioned parameters have been determined in order to demonstrate the body's response to an exercise session. The study involved 14 well-trained teenage swimmers who were asked to warm up for 30 minutes and then swim at a high intensity level for another 30 minutes. Blood samples were taken before and an hour after the exercise, to determine the biochemical parameters in plasma cells and mononuclear immune cells. Plasma levels of anti-inflammatory cytokines IL-1ra, IL-6 and IL-10 were assessed by ELISA. At a cellular level, the expressions of IL-6, IL-10, IL-1 β , cyclooxygenase 2 (COX-2), catalase and nuclear factor kappa β (NF- κ β) were assessed by real time PCR. The results obtained indicate that physical exercise increases plasma concentrations of IL-1ra, IL-10 and IL-6, as well as the expressions of catalase, NF- κ β , COX-2, IL-6, IL-10 and IL-1 β in mononuclear cells. In conclusion, exercise induces a situation of transitory inflammation necessary for the post-exercise recovery of exercised muscles and promotes the activation of adaptive mechanisms. It is therefore advisable to practice regular exercise in order to adapt the body to effort and thus, avoid harmful side effects. In addition, swimming is an interesting sport considering that the body gets little surface impact.

INTRODUCCIÓ

La natació és un tipus d'exercici físic principalment aeròbic, el que requereix un subministrament constant d'oxigen als músculs, a diferència de carreres curtes, a on té més importància la intensitat i la velocitat, pel que els músculs treballen de forma anaeròbica. Malgrat això, la natació comporta períodes curts i repetitius d'hipòxia mentre es té el cap dins l'aigua. La natació, com tot exercici físic es pot realitzar de forma moderada o esgotadora depenent de l'interès del nadador de si vol entrenar-se per mantenir la forma física o entrenar-se per realitzar una competició, per exemple. Una bona pràctica d'aquest esport és molt saludable, no només per l'efecte beneficiós que dona el fer exercici en moderació sinó també perquè la densitat del cos humà és molt similar a la de l'aigua, per el que aquesta suporta el cos de manera que les articulacions i els ossos reben menor impacte.

L'exercici comporta una sèrie de requeriments sobre l'organisme que són dependents del tipus, intensitat i durada del mateix i que, al seu torn, tenen profundes repercussions sobre la capacitat de resposta immune de l'esportista [2]. Després de la pràctica d'un exercici físic es produeix en l'organisme una seqüència d'esdeveniments similars a la resposta immunitària de fase aguda induïda per una infecció. La pràctica d'una activitat física produeix de forma natural microruptures a les fibres musculars, per la qual cosa es posa en marxa tota la maquinària immunitària per afavorir la seva reparació i retorn a la situació de normalitat. Aquesta resposta es caracteritza per l'increment de components activats del complement, increment en el nombre de leucòcits circulants i una major producció de citocines. El

nombre de neutròfils circulants augmenta durant la pràctica de l'exercici i continua augmentant durant el període de recuperació posterior a l'exercici. Els limfòcits, en canvi, augmenten durant l'exercici per posteriorment caure fins a valors inferiors als de partida. La resposta local a una infecció o dany tissular comporta la producció i alliberament de citocines en la zona afectada.

Aquesta resposta de fase aguda és associada a un procés inicialment inflamatori per afavorir l'arribada de mediadors immunològics i afavorir la reparació tissular. Aquesta resposta immune inclou la producció hepàtica d'un nombre important de proteïnes de fase aguda com la proteïna C reactiva (CRP), haptoglobina o la transferrina. No obstant això, l'exercici físic es caracteritza per no desenvolupar una resposta inflamatòria sistèmica de forma completa com la que es dona davant un procés infecciós, sinó que es tracta d'una resposta dirigida a la reparació del teixit danyat per l'activitat física. Dels diferents tipus d'exercici, el que comporta concentracions excèntriques és el que genera més dany tissular i inflamació que no pas un exercici concèntric de la mateixa intensitat i durada [1].

Aquesta inflamació respon a micro-traumatismes musculars que alhora induirà la posada en marxa de processos de reparació, hipertrofia i angiogènesi muscular secundaris a l'exercici. Per tant, la inflamació és un procés essencial en l'adaptació del múscul a l'exercici. Així i tot, no totes les conseqüències de la inflamació muscular són beneficioses [2]. La repetició de reaccions inflamatòries intenses, provocades per càrregues diàries excessives d'entrenament, pot provocar una afecció inflamatòria local de caràcter crònic o recurrent que pot resultar en dolors musculars i disminució del rendiment físic. Ja que la intensitat de la resposta inflamatòria local és proporcional al dany muscular provocat per l'exercici, les càrregues excessives amb component excèntric que provoquen dany muscular, eleven la intensitat de la inflamació fins a un grau en el qual es poden tenir repercussions sistèmiques en l'organisme de l'esportista. Aquesta afectació sistèmica es tradueix en forma de resposta de fase aguda de la inflamació, que quan és intensa i mantinguda al llarg del temps, altera la capacitat immune del esportista i pot conduir a situacions d'immunosupressió, augmentant la susceptibilitat a infeccions i posant en risc la seva salut [3].

LA INFLAMACIÓ

La inflamació és una resposta a la infecció o injúria tissular que està dissenyada per eliminar l'origen del dany i facilitar la reparació tissular. Principalment, es caracteritza per un augment del diàmetre vascular i del flux sanguini, exsudació d'un fluid ric en proteïnes i migració de leucòcits cap al lloc afectat. L'augment del flux sanguini serveix per facilitar el transport de leucòcits i mediadors solubles cap al lloc de dany o infecció. Aquest increment del flux sanguini local es deu a la vasodilatació ocasionada per l'òxid nítric, per les prostaglandines i leucotriens vasodilatadors i per la histamina que s'alliberen al lloc de la injúria. L'òxid nítric causa relaxació del múscul llis vascular reaccionant amb el grup hemo de la guanilat ciclase activant-hi i augmentant la producció de GMPc (guanosín monofosfat cíclic) que exerceix un efecte vasodilatador. Les prostaglandines són produïdes per l'acció de l'enzim ciclooxigenasa i els leucotriens per la lipooxigenasa, a partir de l'àcid araquidònic provinent de les membranes cel·lulars. I, finalment, la histamina és una de les principals amines vasoactives, la qual es troba preformada dins grànuls a les cèl·lules i s'allibera en arribar un estímul. La histamina dilata les arterioles i

augmenta la permeabilitat a les vècules. Tots aquest elements són mediadors precoços de la inflamació alliberats majoritàriament per mastòcits, però també basòfils i plaquetes.

L'increment del flux sanguini durant la inflamació s'acompanya d'un increment de la permeabilitat vascular. El canvi de la permeabilitat vascular es deu a la retracció de les cèl·lules endotelials i al desenvolupament de porus transcitoplasmàtics en aquestes cèl·lules, així com per efecte directe de la injúria causada pel trauma o pels productes tòxics alliberats pels leucòcits [4]. La migració dels leucòcits és un altre component clau en la resposta inflamatòria. La exsudació de fluid ric en proteïnes des del compartiment vascular porta com a conseqüència hemoconcentració i estasi en el lloc de la injúria. Aquest procés facilita el moviment de leucòcits cap al lloc de la inflamació que és intervinguda per factors quimiotàctics, entre els quals podem esmentar productes bacterians, components del complement i algunes citocines (IL-8, LPS, C5). A més l'endoteli vascular expressa una gran quantitat de molècules d'adhesió, a les quals s'uneixen als leucòcits circulants afavorint que es pugui dur el procés de diapedesi i l'arribada d'aquestes cèl·lules al teixit alterat.

La resposta immune funciona de manera efectiva per limitar la infecció i promoure la reparació tissular. Normalment hi ha un balanç entre citocines pro-inflamatòries com el TNF α , interleucina 1 (IL-1), IL-12 i l'interferó γ (IFN- γ) i senyals antiinflamatòries com IL-10, IL-4, IL-6, factor de creixement transformador β (TGF- β), l'antagonista del receptor IL-1 i algunes prostaglandines. Aquest balanç resulta d'una activació efectiva i subsegüent resolució de la resposta inflamatòria. No obstant això, en alguns casos on predomina la resposta pro-inflamatòria pot originar-se una inflamació sistèmica severa que ha estat tipificada com a síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS). Recíprocament, quan predomina la resposta antiinflamatòria pot desenvolupar-se un estat de immunosupressió relativa, aquest fenomen, que pot veure's després d'un trauma major, de una injúria tèrmica o d'un estat de post sèpsia, es coneix com a síndrome de resposta compensadora antiinflamatòria (CARS). Els pacients que presenten CARS són més susceptibles de desenvolupar infeccions greus [5].

Per tant, cal dir que la inflamació és un procés bastant complex a on intervenen diversos tipus cel·lulars, així com, una gran quantitat de molècules. Pel que es requereix una correcta regulació de tota la seqüència de processos que hi participen per tal d'evitar danys al teixit o afavorir infeccions.

LES CITOCINES

Les citocines són un tipus de mediadors que tenen la funció d'actuar com missatgers fisiològics de la resposta inflamatòria. Són petites molècules peptídiques, la funció de les quals és intervenir en la transmissió d'informació (senyals) d'una cèl·lula a una altra i són biològicament actives en concentracions reduïdes. Són produïdes per diversos tipus de cèl·lules en resposta a diferents estímuls, com potser el múscul en contracció o les cèl·lules immunitàries. Les citocines són induïdes en resposta a estímuls exògens i generalment exerceixen el seus efectes de forma autocrina i paracrina. Malgrat això, algunes citocines com la IL-1, la IL-6 i el factor de necrosi tumoral α (TNF- α) poden exercir la seva funció d'una forma més general i actuar de forma endocrina [4].

Les citocines es divideixen en una sèrie de famílies (Tabla 1). S'uneixen a receptors específics de les cèl·lules diana, provocant en aquestes cèl·lules modificacions que porten a la síntesi i alliberament de mediadors secundaris, per exemple en la

inflamació indueixen l'alliberament d'altres citocines, òxid nítric (NO) o metabòlits de l'àcid araquidònic (prostaglandines i leucotriens). Les citocines participen en la regulació de les respostes inflamatòries secundàries a l'exercici. La infecció és el major estímul per a l'alliberament de citocines per l'acció de molècules bacterianes com l'endotoxina (LPS) que són reconegudes per les cèl·lules del sistema immune innat. Altres estímuls no infecciosos poden de la mateixa manera induir la seva síntesi i alliberament desencadenant la reacció inflamatòria, com és en el cas de l'exercici físic.

Les principals citocines pro-inflamatòries són el TNF- α , les interleucines IL-1 β , i IL-8 i els interferons en canvi les principals citocines antiinflamatòries són les interleucines IL-10, IL-6 i IL-1ra [3]. Cal destacar que la IL-6 es va considerar inicialment com una citocina pro-inflamatòria sobretot perquè té aquesta funció en processos infecciosos però avui en dia, en el context de l'activitat física es considera com antiinflamatòria.

La IL-6 és una citocina o també anomenada miocina que és alliberada principalment pel múscul i que exerceix funcions autocrines, paracrines o endocrines. La IL-6 com a citocina és també secretada per les cèl·lules T i els macròfags per estimular la resposta immune, per exemple, durant la infecció i després d'un trauma, especialment cremades o un altre dany tissular que condueix a la inflamació [6]. La IL-6 com a miocina s'eleva en resposta a la contracció muscular i per tant s'eleva significativament amb l'exercici, i precedeix a l'aparició d'altres citocines en la circulació. El paper de la IL-6 com una citocina antiinflamatòria és intervinguda a través dels seus efectes inhibitoris sobre el TNF- α i IL-1, i l'activació d'IL-1ra i IL-10 [7].

FAMÍLIA ESTRUCTURAL	CITOCINES
Citocines de tipus 1	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15 i alguns factors de creixement hematopoètics.
Citocines de tipus 2	Interferons, IL-10
Família de TNF	TNFs, Leucotriens
Membres de la superfamília de Ig	IL-1, Quimiocines

Taula 1. Famílies estructurals de citocines

L'exercici, quan indueix dany muscular, ja sigui per microtraumes adaptatius, isquèmia / hipòxia local, contusions, o bé pel tipus d'exercici desenvolupat, s'associa a elevació dels nivells de citocines pro i antiinflamatòries. Quan l'exercici és lleuger produeix l'augment de la concentració sèrica d'IL-6, però no de TNF α ni d'IL-1 β [8]. En l'exercici intens l'elevació de IL-6 es correlaciona amb la de l'activitat de la creatina quinasa, que és un marcador indirecte del dany muscular [9]. Les citocines s'alliberen en resposta a l'exercici extrem de manera seqüencial, de la mateixa manera que en la resposta a estímuls sèptics. La concentració d'IL-6 augmenta fins a cent vegades immediatament després de l'exercici.

La producció d'IL-1 pels macròfags augmenta durant i després de l'exercici perllongat. El nivell d'IL-1 en repòs és més gran en les persones entrenades que en les persones desentrenades [10]. Les citocines antiinflamatòries estan implicades en

la limitació espacial i la terminació temporal de la resposta inflamatòria. A conseqüència de l'exercici s'eleva però amb una cinètica més endarrerida que les pro-inflamatòries [3]. L'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1ra) inhibeix l'activitat de la IL-1 bloquejant el seu receptor. La IL-1ra aconsegueix els seus màxims nivells en una o dues hores després de l'exercici. La IL-10 és una citocina de gran potencial antiinflamatori. El fet que IL-10 actuï com una molècula antiinflamatòria es va suggerir principalment a partir d'estudis que mostren la inhibició de la síntesi d'un ampli espectre de citocines pro-inflamatòries per diferents cèl·lules, en particular de l'estirp monocític. Per tant, la IL-10 inhibeix la producció d'IL-1 α , IL-1 β , i TNF- α , així com la producció de quimiocines, incloent la IL-8. Aquestes citocines i quimiocines juguen un paper crític en l'activació de granulòcits, macròfags, cèl·lules assassines naturals, cèl·lules T i B i en el seu reclutament als llocs d'inflamació. En conjunt, aquestes observacions van suggerir que IL-10 juga un paper important en l'organització de la reacció inflamatòria que implica l'activació de macròfags. La IL-10 també evita la síntesi de citocines pels mecanismes post-transcripcionals [11].

LES ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN

Estudis recents mostren que en molts processos inflamatoris i isquèmics, un metabolisme anormal de l'oxigen pot tenir importància en els mecanismes de lesió cel·lular. La toxicitat de l'oxigen s'explica per la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquestes ROS són altament reactives i es poden diferenciar entre radicals lliures o formes no radicalàries (segons sigui àtoms o molècules amb electrons de valència desaparellat o no). Les cèl·lules, en condicions normals, generen radicals lliures com a part dels seus processos metabòlics, com per exemple, la fosforilació oxidativa.

Són varies les causes de producció d'espècies reactives (ROS) durant l'exercici físic. Per una banda, quan es practica exercici, es necessita una gran quantitat d'energia, per la qual tenim un metabolisme molt actiu per produir-la. Aquest augment metabòlic provoca un increment del consum d'oxigen en gran mesura i, com a conseqüència, una gran quantitat de formació de ROS [12]. Una major font d'aquests durant l'exercici provoca una fuga d'electrons des de la cadena de transport d'electrons, el que augmenta la formació de més espècies reactives d'oxigen, el que fa que estiguem en un cercle viciós. Una font important de ROS són les reaccions catalitzades per algunes oxidases, com la xantina oxidasa (catalitza l'oxidació de la xantina i la hipoxantina al metabolisme de les purines), i l'activació de les cèl·lules immunitàries com els neutròfils i macròfags. Aquestes cèl·lules expressen l'enzim NADPH oxidasa, que catalitza la producció d'anió superòxid a partir d'oxigen i NADPH [13].

Igualment, a causa de la redistribució sanguínia durant l'exercici i sobretot a esforços de alta intensitat, el teixit muscular pot romandre durant algun temps en estat d'isquèmia, per a posteriorment, en la recuperació patir una alta reperfusió d'oxigen i és per aquesta arribada massiva de oxigen per la qual es produeixen moltes ROS [14]. Relacionat, també, amb la intensitat de l'esforç, un altre factor que pot influir en la formació de ROS és la producció d'àcid làctic, que pot convertir un radical lliure poc nociu (radical superòxid) en un altre molt més perjudicial (radical hidroxil), per la interacció del primer amb els protons derivats de l'àcid làctic [15]. També sembla ser que a partir de la autooxidació de catecolamines durant l'exercici, es poden produir radicals lliures [16].

La hipòxia, entesa com la falta relativa d'oxigen per cobrir les demandes metabòliques, i la reoxigenació, entesa com la reintroducció d'oxigen en el teixit hipòxic, són importants ja que apareixen en una gran varietat de situacions patològiques. Davant una situació d'hipòxia, les cèl·lules experimenten canvis específics en les activitats enzimàtiques com és la funció mitocondrial, el transport de membrana i les defenses antioxidants; aquests canvis en conjunt predisposen al dany per reoxigenació. Els neutròfils activats poden contribuir al dany vascular durant la reoxigenació, encara que el dany cel·lular post-hipòxic també pot produir-se en absència de cèl·lules inflamatòries per mitjà de mecanismes que involucren ROS. La hipòxia induïx la transformació de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa generant anió superòxid [17]. Els mitocondris en situacions d'hipòxia produeixen un excés d'anió superòxid a causa d'una disminució d'alguns enzims com la citocrom C oxidasa. Els nivells d'hemoglobina lliure augmenten després d'una situació d'hipòxia-reoxigenació i generen intermediaris oxidats durant el procés de reoxigenació capaços d'induir dany oxidatiu. La hipòxia induïx la forma induïble de l'enzim òxid nítric sintasa, augmentat els nivells de NO que poden generar peroxinitrit [18].

Les ROS s'han considerat durant molt de temps únicament com a vehicles de destrucció cel·lular, però actualment, es coneixen també per la seva capacitat de controlar cascades de senyalització cel·lular importants com en processos inflamatoris o en mecanismes d'adaptació al estrès oxidatiu muscular. A més, alguns productes derivats de la acció de les ROS sobre biomolècules estan implicats en la regulació de processos cel·lulars [19].

A concentracions moderades, les ROS juguen un paper important com a missatgers cel·lulars reguladors en els processos de comunicació i senyalització intra i intercel·lular. Les ROS influencien l'expressió de gens i de vies de transducció de senyals. Alguns d'aquests gens o vies de transducció són la via de les MAP quinases i el factor NF- κ B. No es sap molt clar de quina manera poden activar aquests processos, però en molts de casos pareixen ser mediat per la oxidació o reducció de grups tiols. Canvis en l'estat redox de les proteïnes provoquen canvis conformacionals a les proteïnes el que pot augmentar o disminuir la capacitat d'unió a ADN o alliberar proteïnes inhibides. Una sobreproducció de ROS podria induir la activació de mecanismes de defensa per pal·liar el dany oxidatiu que s'hagi pogut causar [20]. Per contrarestar aquests radicals lliures, les cèl·lules disposen de un sistema antioxidant que les permet mantenir un balanç equilibrat. Quan aquesta producció de ROS excedeix la capacitat antioxidant de l'organisme es genera un desequilibri que provoca estrès oxidatiu i dany cel·lular [25]. Entre els problemes provocats per ROS, podem destacar la disfunció mitocondrial, peroxidació lipídica i com a conseqüència la destrucció de les membranes, oxidació de les proteïnes que pot causar l'acumulació de proteïnes mal plegades i l'oxidació de l'ADN que pot provocar mutagènesi. Tots aquests efectes desembocarien a la mort cel·lular per necrosi i apoptosi. La interacció lesiva d'aquests ROS es el que es coneix com a dany oxidatiu [22].

L'organisme té diversos mecanismes antioxidants, entre el que podem destacar els enzims antioxidants on destaca la catalasa, que neutralitza el peròxid d'hidrogen passant-ho a oxigen i aigua, la superòxid dismutasa, que converteix el radical superòxid a peròxid d'hidrogen, i les glutatió peroxidasa i reductasa, un converteix el peròxid d'hidrogen en aigua mitjançant el glutatió i l'altra regenera el glutatió respectivament [23]. La glutatió peroxidasa també actuar sobre hidroperòxids reduint-los a alcohols. Com a antioxidants proteics també es poden incloure les

proteïnes desacoblants (UCPs) presents a la membrana mitocondrial interna i que estan involucrades en la defensa contra l'estrès oxidatiu [24]. A més, existeixen altres antioxidants no enzimàtics com són les vitamines A, C i E, el glutatió, carotenoides, flavonoides i varis minerals que poden actuar prevenint la formació de ROS, interceptant l'atac d'aquests, captant els metabòlits reactius i convertir-los en molècules menys reactives [25]. Molts d'aquests antioxidants no enzimàtics són exògens i per tant s'han d'incorporar a través de la dieta. L'expressió dels enzims antioxidants a les cèl·lules immunitàries es induït i regulat pels ROS i les citocines [26-27].

La suplementació de la dieta amb nutrients antioxidants podrien eliminar l'activació endògena de les defenses antioxidants a causa de la desactivació directa de ROS pels antioxidants exògens. De fet, alguns estudis de dieta de suplementació han demostrat que els nutrients antioxidants atenuen l'activació enzims d'antioxidants com la catalasa, glutatió peroxidases i superòxid dismutasa [28] o induïx d'òxid nítric sintasa. Per tant, la dosificació de nutrients antioxidants és crucial per tal de reduir el dany oxidatiu, i, al mateix temps, per mantenir o millorar les defenses antioxidants endògenes [29].

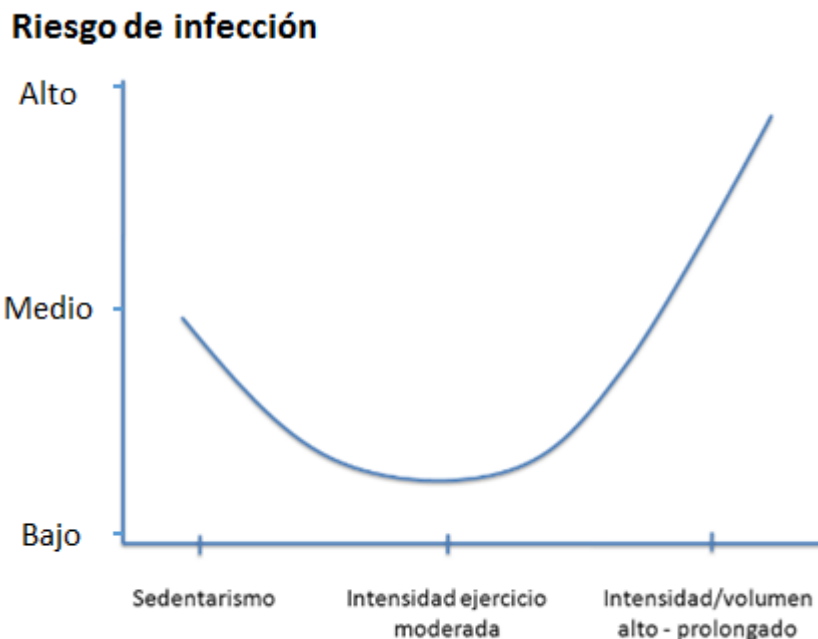
EFFECTES POSITIUS I NEGATIUS DE L'EXERCICI

Efectes Positius

Els efectes positius de la pràctica regular d'exercici són resultat d'una complexa interacció entre efectes fisiològics i psicològics. La creixent popularitat de la pràctica d'exercici físic és degut probablement a un augment en el coneixement públic dels efectes beneficiosos sobre el benestar físic i emocional. L'exercici moderat realitzat regularment, produeix alguns efectes beneficiosos sobre la capacitat de resposta immune enfront de la infecció. A llarg termini induïx un increment de l'activitat citotòxica espontània de les cèl·lules NK [9].

A més, l'activitat física lleugera estimula certes funcions immunes, que pel contra, són inhibides per l'activitat física extenuant com es pot veure en la imatge 1. L'efecte de l'activitat citotòxica augmenta la resistència a infeccions virals i contribueix a l'eliminació de cèl·lules pre-neoplàsiques [30]. Així doncs, un règim regular d'exercici moderat pot ajudar a la gent major a mantenir una bona qualitat de vida, en contribuir a la preservació de la funció immune. Per tant, l'exercici moderat contribuiria a contrarestar els efectes adversos de l'envelliment sobre el sistema immune [10].

Un altre efecte positiu que aporta l'exercici sobre l'organisme és la gran relació que té amb les malalties cardiovasculars i la diabetis tipus II [27-28]. L'exercici físic té un efecte preventiu d'aquestes malalties. El mecanisme fisiològic per el qual l'activitat física beneficia els pacients amb aquestes malalties o redueix la possibilitat de patir-les seria degut a la modificació de la composició corporal (augmenta la massa muscular i disminueix el percentatge de grassa). Aquest canvi permet disminuir la lipotoxicitat que condueix un alt percentatge de grassa i com a conseqüència poder reduir els problemes que això provoca com per exemple és la resistència a la insulina, l'augment de receptors en les cèl·lules de diferents molècules com el de la glucosa, de la insulina o de les lipoproteïnes. A més, també dir l'efecte cardioprotector que obtenim amb l'exercici físic.



Imatge 1: Representa la relació que hi ha entre el grau d'exercici físic i la incidència de infeccions.

Efectes Negatius

L'exercici extenuant i de llarga durada, com és l'esport professional de competició, produeix un quadre de resposta de fase aguda, i fins i tot, una immunosupressió que pot arribar a comprometre la salut de l'esportista i el seu rendiment atlètic. En els casos més severos, els atletes pateixen, a més d'una disminució del rendiment i una susceptibilitat augmentada a les infeccions, altres símptomes comuns al síndrome de resposta inflamatòria sistèmica com són la fatiga, la pèrdua de pes i les alteracions de l'estat anímic [8]. També s'associa amb una major susceptibilitat de patir infeccions a les vies respiratòries altes i pot augmentar la severitat d'algunes malalties. La immunosupressió produïda per exercicis extrems és similar a la generada per l'estrès físic sever com les situacions de cirurgia, traumatismes i cremades. En aquestes, disminueix el nombre de limfòcits en sang, i es redueix la seva capacitat proliferativa i citotòxica espontània. Així mateix, s'eleva els nivells sèrics de citocines pro-inflamatòries i antiinflamatòries, a més de produir-se neutrofilia i alteració en la funció dels neutròfils. Els patògens, especialment els virus del tracte respiratori, poden establir infeccions durant aquesta immunosupressió transitòria que es manté de 2 a 72 hores després de l'exercici, tot i que els efectes aguts s'observen de 2 a 4 hores post-exercici [9].

S'ha suggerit que en els atletes d'elit ben entrenats, la major susceptibilitat a les infeccions pot ser degut a una immunosupressió més duradora provocada per l'acumulació d'un excés de càrrega de entrenament. Altres factors com l'estrès psíquic, la malnutrició o la pèrdua de pes, poden tenir un efecte sinèrgic sobre la immunosupressió causada per l'excés d'exercici. Si aquesta es combina amb dèficit en la higiene i amb condicions ambientals adverses, el risc d'infecció pot incrementar-se. En conjunt, aquestes troballes proporcionen possibles mecanismes a les evidències epidemiològiques de la major incidència de malalties infeccioses a

esportistes durant períodes d'entrenament intensiu i alta competició. També el risc de patir infeccions de vies respiratòries altes s'ha correlacionat amb la disminució dels nivells d'IgA, sobretot en esportistes que practiquen exercicis de resistència.

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar la resposta inflamatòria avaluant l'expressió de gens a cèl·lules mononucleades i nivells de citocines circulants induïda per una sessió d'activitat física com es la natació. També s'ha determinat la resposta antioxidant que es produeix en el període post-exercici per intentar pal·liar les espècies reactives d'oxigen produïdes durant la sessió de natació.

Aquest objectiu general es pot desglossar en els següents objectius més específics:

- Resposta pro/antiinflamatòria de les cèl·lules immunitàries mononucleades associada a l'activitat física per mitjà de l'avaluació dels nivells d'expressió de les IL-6, la IL-10, el IL-1ra, IL-1 β , NF- κ β i la COX-2.
- Avaluar la resposta antiinflamatòria plasmàtica posterior a la sessió per mitjà de la determinació dels nivells de citocines IL-6, la IL-10, el IL-1ra.
- Determinar la resposta antioxidant de les cèl·lules immunitàries mononucleades induïda per la sessió de natació avaluant l'expressió de l'enzim catalasa.

MATERIALS I MÈTODES

PARTICIPANTS I PROTOCOL

Catorze nines adolescents participaren voluntàriament a aquest estudi. Eren totes nedadores que pertanyien a equips d'aficionats. Totes elles entrenen 6 dies a la setmana. Els dilluns, dimecres i divendres entrenen 5 hores cada dia. I els dimarts, dijous i dissabtes entrenaven 3 hores al dia. Les característiques antropomètriques de les participants en l'estudi es presenten a la Taula 2. Els pares de les participants i les nadadores varen ser informats del propòsit d'aquest estudi i dels possibles riscos involucrats abans que donessin el seu consentiment escrit. El grup de participants era homogeni en quant a l'edat, el pes, sexe i alçada. Els subjectes eren no obesos i no fumadores i no prenién cap tipus de medicament.

Només les nedadores amb cicles menstruals regulars (cicle de longitud entre 28 i 30 dies) que es trobaven entre els primers dies de la fase fol·licular del cicle menstrual (entre els dies 4 i 8 després de la menstruació) van ser inclosos en l'estudi, ja que les diferències en els nivells circulants de les hormones sexuals podrien influir en la resposta antioxidant. El protocol d'estudi va ser en conformitat amb la Declaració d'Hèlsinki d'acord a les normes ACSM (American College of Sports Medicine) per a la cura dels Subjectes Humans i va ser aprovat pel comitè d'investigacions clíniques de bioètica de les Illes Balears.

La sessió d'exercici va ser la següent: Les participants van escalfar durant 30 minuts abans d'iniciar el protocol d'exercici. Després d'escalfar, els participants van començar amb una sèrie intermitent de 50 metres nadant durant 30 minuts mantenint la intensitat al voltant de 75-80% de la seva capacitat màxima, que es controlava mitjançant el temps que tardaven per completar cada un dels 50 metres de natació en relació amb el millor temps que van aconseguir fer les proves preliminars. A les nedadors se les va permetre 10-15 segons de descans entre les sèries. Les proves pilot foren realitzades per permetre el disseny individual del protocol i per assegurar que totes les nedadores eren capaços de completar el protocol d'exercici.

La sessió de natació va resultar ser un entrenament d'intensitat moderada per als participants en l'estudi. Les mostres de sang es van obtenir abans (en condicions basals després d'una nit en dejú) i 1 hora després de la natació, ja que els canvis en els enzims antioxidants i l'aparició de dany oxidatiu es més evident 1 hora després d'acabar la sessió d'exercici en lloc d'immediatament després [39-40].

	<i>Nines</i>
Edat	16.1 ± 2.2 anys
Pes	60.4 ± 4.2 Kg
Alçada	167 ± 6 cm
BMI	21.6 ± 1.6 Kg/m ²

Taula 2: Característiques antropomètriques dels participants

PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

Les mostres de sang venosa es varen obtenir de la vena cubital de nedadores mitjançant tubs buits adequats, els quals contenien EDTA com anticoagulant. Els recomptes de leucòcits i els paràmetres hematològics es van determinar en la sang completa. El plasma i els eritròcits es van obtenir després de la centrifugació de les mostres de sang a 1.000 g, 4C^o durant 30 minuts.

La fracció de limfòcits es va purificar a partir de sang completa seguint una adaptació del mètode descrit per Boyum (1964) [33] utilitzant el reactiu PLUS Ficoll-Paque (GE Healthcare, Chalfont St Giles, RU) i les mostres es van emmagatzemar a -80C^o fins que es varen analitzar, a excepció del dany a l'ADN causat durant l'assaig, que es va analitzar immediatament després de la purificació de limfòcits. Les interleucines 1 β , 1-ra, 6 i 10, la NF-k β , la ciclooxygenasa 2 i l'activitat de la catalasa es van mesurar en els limfòcits. El recompte de leucòcits i eritròcits es va determinar en un citòmetre de flux automàtic analitzador Technicon H2 (Bayer) VCS system.

DADES ANTROPOMÈTRIQUES

Les variables antropomètriques mesurades en aquest estudi van ser: pes, alçada, massa corporal, braç, cintura, maluc i perímetres de la cuixa i la composició corporal. L'estatura es va determinar fent servir un antropometria mòbil (Kawe 44444, França) amb una precisió de mil·límetre, amb el cap del participant en el pla de Frankfurt. La massa corporal era a prop de 100 g utilitzant una balança digital (Tefal, sc 9210, France). Els participants van ser pesats descalços i usant roba interior, que es va representar restant 300 g al pes obtingut.

Els perímetres del bíceps, cintura, maluc i cuixa es van mesurar amb una precisió de 0,1 cm amb el braç dret del participant relaxat, amb una cinta mètrica no extensible (Kawe, 43972, França). El percentatge de greix corporal i la massa de greix corporal es van calcular mitjançant bioimpedància utilitzant una unitat de mà BIA (Omron HBF 300 cos del monitor de greix). Totes les mesures antropomètriques van ser realitzades per un mateix observador per tal de evitar la variació entre mesures.

Els diferents índexs antropomètrics es van calcular utilitzant aquests mesuraments: índex de massa corporal [IMC = pes (kg) / alçada al quadrat (m)]; índex cintura-maluc [perímetre de la cintura (Cm) / perímetre del maluc (cm)].

L'EXPRESSIÓ GÈNICA ARNm

L'expressió gènica de la IL-6, IL-10, IL-1ra, IL-1 β , NF-k β , ciclooxygenasa 2, i la catalasa es va determinar per mitjà de PCR a temps real (PCR- RT) i com a gen de referència es va utilitzar el ribosòmic 18S. Per aquest propòsit, es va aïllar l'ARNm a partir de limfòcits mitjançant extracció amb fenol-cloroform. Es prepara una dilució 1/10 de l'ADNc obtingut per RT i es barregen 2 μ l d'aquesta dilució amb 9 μ l de Syber Green-mix que conté 5 μ l de Power Syber Green, 0,45 μ l de cada un dels primers (forward i reverse) i 3,1 μ l d'aigua lliure de ARNasas per a cada mostra. La PCR es realitza en el termociclador Step One Plus TM sota les següents condicions: un cicle de desnaturalització a 95°C durant 10 minuts per separar les cadenes d'ADNc, 40 cicles a dues temperatures, 15 segons a 95°C per activar l'enzim i 1 minut a 60°C per a la unió al encebador i l'elongació de la cadena.

Per comprovar l'existència d'un únic producte d'amplificació es determina la corba de fusió, seguint les condicions següents: 15 segons a 95°C, 1 minut a 60°C i 15 segons a 95°C. Els primers específics i les condicions d'amplificació usades per cada gen es troben representades a la taula 3. La quantificació relativa es va realitzar mitjançant càlculs estàndard considerant $2^{(-DDCt)}$. Els nivells basals d'ARNm en l'inici de l'etapa van ser referits arbitràriament com un. L'expressió del gen diana es va normalitzar respecte a 18S ribosomal.

Gene	Primer	Temp
IL-6	Fw: 5'- ACC TGA ACC TTC CAA AGA TGG C-3' Rv: 5'- TCA CCA GGC AAG TCT CCT CAT TG-3'	63°C
CAT	Fw: 5'-TTT GGC TAC TTT GAG GTC AC-3' Rv: 5'-TCC CCA TTT GCA TTA ACC AG-3'	60°C
Ciclox2	Fw: 5'- TTG CTG GCA GGG TTG CTG GTG GTA-3' Rv: 5'- CAT CTG CCT GCT CTG GTC AAT GGA A-3'	67°C
NK-kB	Fw: 5'- AAA CAC TGT GAG GAT GGG ATC TG-3' ' Rv: 5' - CGA AGC CGA CCA CCA TGT-3' '	60°C
IL-1B	Fw: 5'- GGA CAG GAT ATG GAG CAA CA-3' Rv: 5'- GGT AGA CTC AAA TTC CAG CT-3'	58°C
IL-10	Fw: 5'-AGA ACC TGA AGA CCC TCA GGC-3' Rv: 5'-CCA CGG CCT TGC TCT TGT T-3'	58°C
18S	Fw: 5'-GACTCAACACGGGAAACCCTCAC-3' Rv: 5'-GACTCAACACGGGAAACCCTCAC-3'	60°C

Taula 3. Primers i condicions usades a la PCR a temps real

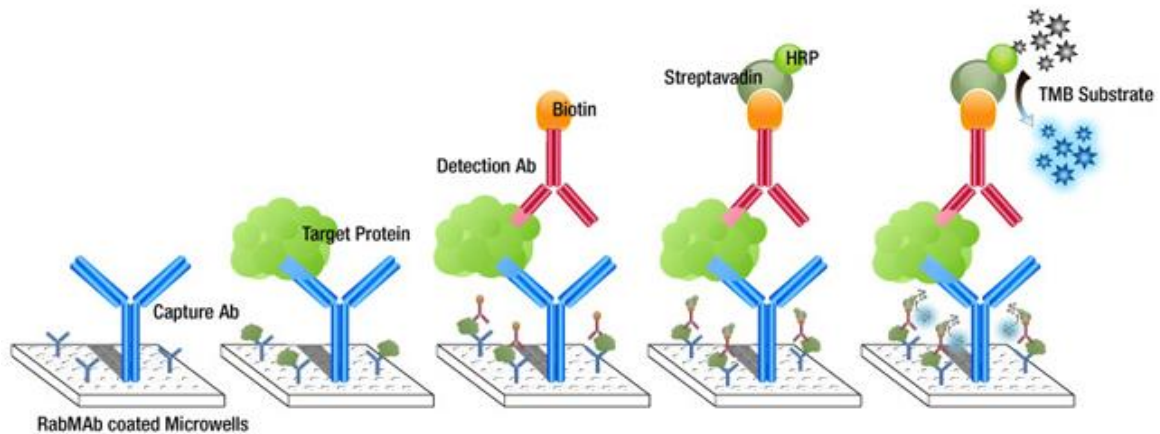
DETERMINACIÓ DE INTERLEUCINES MITJANÇANT ELISA

S'ha realitzat un anàlisi quantitatiu dels nivells de IL-6, IL-10 i IL-1ra, per mitjà de la tècnica de immuno-absorció lligada a enzims (ELISA). Aquesta tècnica es basa en el fet que sobre una fase sòlida es fixa una capa d'anticossos anti les interleucines estudiades. En concret, es va realitzar una ELISA indirecta, consisteix en que un cop els antígens són immobilitzats, es detecten amb un segon anticòs enllaçat a un enzim capaç de generar un producte detectable que després es mesurarà mitjançant espectrofotometria. La quantitat d'absorbància és directament proporcional a la quantitat de antigen. S'utilitzaren els següents kits de ELISA seguint les recomanacions del fabricant:

- Per a la determinació de les IL-10 i la IL-6 es van utilitzar kits de la casa comercial Diaclone SAS "Human IL-10 ELISA Kit" (Catalog Number: 950.060.096)[35] i "Human IL-6 ELISA Kit" (Catalog Number: 950.030.096)[36] respectivament. El límit de detecció per la IL-10 és de 4,9pg/ml i el rang de la corba estàndard és de 400pg/ml-12,5pg/ml. En canvi, el límit de detecció de la IL-6 és de 2pg/ml i el rang de la corba estàndard es de 200pg/ml – 6,25pg/ml.

- Per a la determinació de la IL-1ra es va utilitzar un kit de la casa comercial Cusabio® "Human Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) ELISA Kit" (Catalog Number: CSB-E10396h)[37]. El límit de detecció és de 19.5 pg/ml i el rang de la corba estàndard es de 78 pg/ml-5000 pg/ml. Aquest kit es basa en el mateix principi que els altres dos kits utilitzats, l'única diferència és que el complex utilitzat és de avidina-HRP, a diferència dels altres que utilitzen un complex d'estreptavidina-HRP.

En els tres es va seguir el protocol establert per la casa comercial i es va realitzar una recta patró per així determinar la concentració d'IL-10, d'IL-6 i d'IL-1ra de les diferents mostres. La lectura de totes les plaques es va realitzar a una longitud d'ona de 450 nm en un lector automàtic per plaques d'ELISA (Microplate Reader, Elx808, BioTek Instruments, USA).



Imatge 2: Representació gràfica del mecanisme general de funcionament de les ELISAs utilitzades.

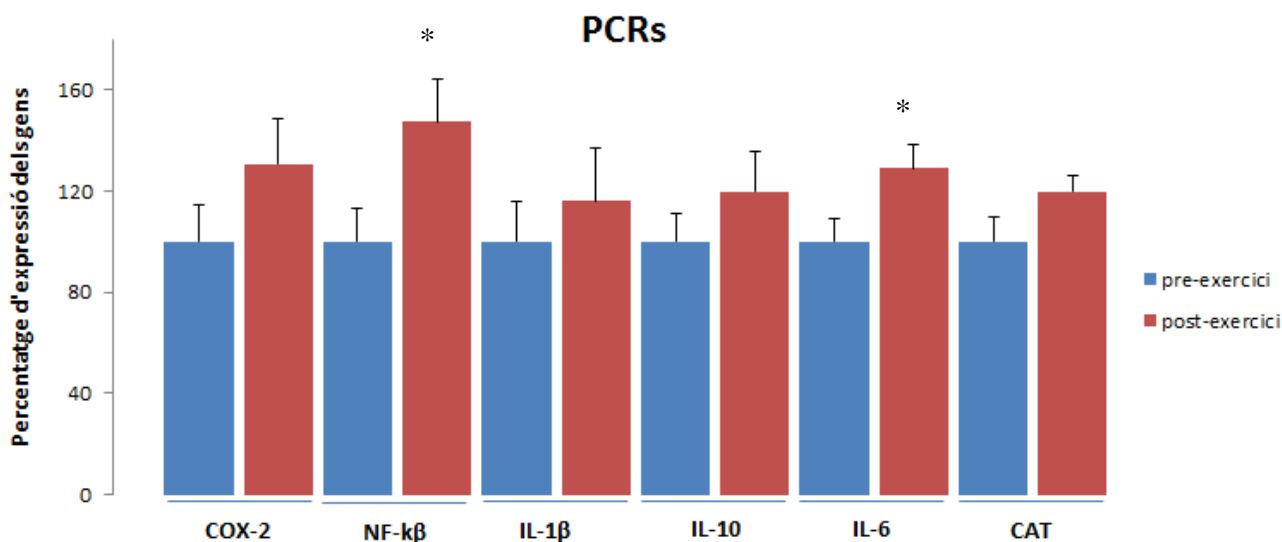
ANÀLISIS ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic es va dur a terme mitjançant el programa informàtic Excel. Els resultats són expressats com a mitja \pm S.E.M, i un valor de $p < 0,05$ es considera significant. El test de t-Student ha estat utilitzat per identificar diferències significatives a l'inici i al final de l'exercici.

RESULTATS

DETERMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LA COX, NF-KB, IL-1B, IL-10, IL-6 I CAT.

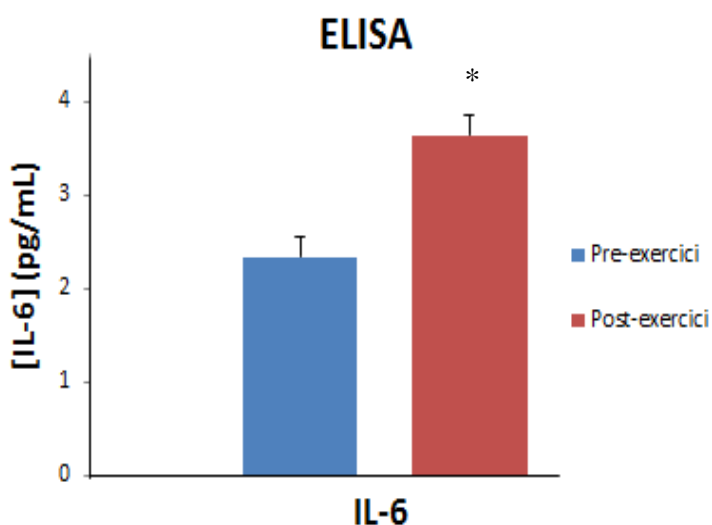
L'expressió de la IL-1 β , de la IL-6, IL-10, la catalasa, el NF-k β i la ciclooxigenasa-2, estan representades en el *Gràfica 1*. L'expressió d'aquestes proteïnes es va realitzar mitjançant PCR a temps real i com es pot veure en la gràfica tots aquestes incrementen després de l'exercici, però, aquest augment no és estadísticament significatiu en cap d'ells. Únicament els valors per NF-k β i la IL-6 han sortit estadísticament significatius, el que indica que l'increment és degut a l'exercici.



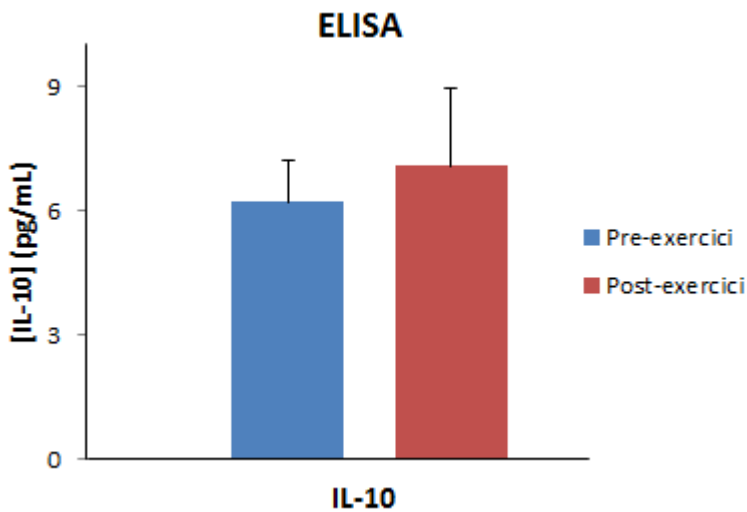
Gràfica 1. Efectes d'una sessió de natació, en l'expressió de la COX-2, NF-Kβ, IL-1β, IL-10, IL-6 i CAT. Els nivells significatius ($p < 0.05$) comparats amb el pre-exercici s'indiquen amb un asterisc (*).

DETERMINACIÓ DE INTERLEUCINES MITJANÇANT LA TÈCNICA DE IMMUNOABSORPCIÓ LIGADA A ENZIMS (ELISA)

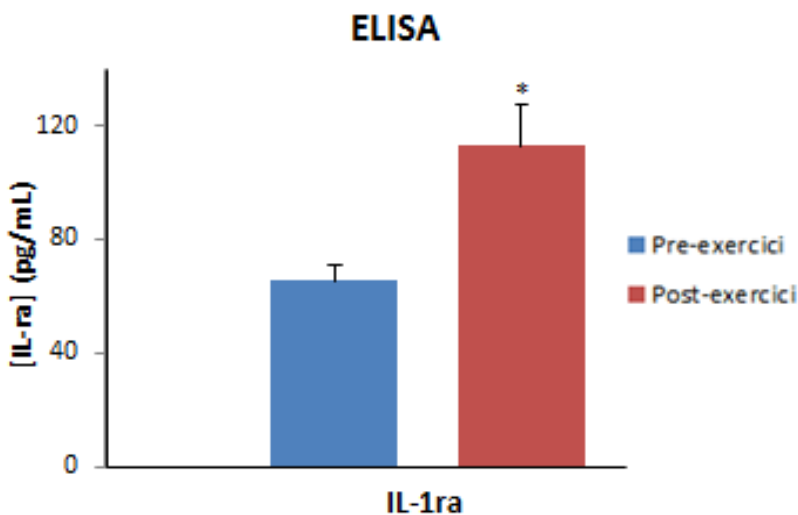
El nivell plasmàtic de les interleucines IL-6, IL-10 i IL-1ra es va realitzar per mitjà la tècnica de ELISA. En les gràfiques 2, 3 i 4 es pot veure com hi ha un increment de la concentració de cada una en un entrenament de natació. Tal com s'observa en les gràfiques 2 i 4 la síntesis de la IL-6 i de la IL-1ra després de la sessió de natació augmenten de forma significativa ($p < 0.05$). Mentre que, en el cas de la IL-10 s'observa un petit increment de la seva producció post-exercici però cal dir que la diferència no arriba a ser estadísticament significativa ($p > 0.05$).



Gràfica 2. Quantitat de IL-6 expressat en pg/mL abans i després d'un entrenament de natació. Els nivells significatius ($p < 0.05$) comparats amb el cas Pre-exercici s'indiquen amb un asterisc (*).



Gràfica 3. Quantitat de IL-10 expressat en pg/mL abans i després d'un entrenament de natació. No hi ha diferències significatives



Gràfica 4. Quantitat de IL-1ra expressat en pg/mL abans i després d'un entrenament de natació. Els nivells significatius ($p < 0.05$) comparats amb el cas Pre-exercici s'indiquen amb un asterisc (*).

DISCUSSIÓ

ESTUDI EN CÈL·LULES MONONUCLEADES DESPRÉS DE L'EXERCICI

Degut a la dificultat que presenta el fet d'obtenir mostres de biòpsies musculars s'han utilitzat les cèl·lules mononucleades sanguínies com a model d'estudi per avaluar els efectes de l'activitat física sobre la resposta pro-antiinflamatòria.

La resposta de les cèl·lules mononucleades davant un estímul, com potser l'activitat física, indueix tota una sèrie de adaptacions que comporten un canvi en la expressió de gens, com és la síntesis de citocines i d'enzims antioxidants. Aquesta resposta és deguda a l'activació de varis factors de transcripció destacant el NF- κ B. Aquest factor de transcripció es troba implicat en la resposta cel·lular enfront a estímuls com poden ser diverses citocines, antígens bacterians o ROS. A més, té un paper molt important en la resposta inflamatòria i immunitària. NF- κ B actua com un dímer, però en condicions basals es troba inhibït per la seva unió a la I κ B, proteïna que el manté segregat en el citoplasma evitant que dugui a terme la seva funció com a factor de

transcripció [38]. Durant una sessió d'exercici físic, es produeixen ROS en gran quantitat, la qual cosa provoca una resposta immunitària de fase aguda degut a les microruptures musculars provocades per l'exercici, i a l'hora activa una resposta antioxidant per evitar l'aparició de dany oxidatiu. Aquest procés s'evidencia per l'augment del nivell de citocines inflamatòries. L'activació de l'expressió NF- κ B causada per certes citocines, concretament IL-1 β y TNF- α , deriva de la unió del lligand als seus receptors a nivell de membrana activant varies vies que augmenten l'expressió del gen [39-40]. Per exemple, la unió de la citocina IL-1 β al seu receptor activa una via de quinases que condueix a una elevada expressió de la proteïna I κ B quinasa (IKK β), la qual fosforila l'inhibidor I κ B la qual cosa conduirà a la seva degradació proteolítica, activant-se així l'expressió de NF- κ B. Per altra banda, la unió de la citocina al receptor també augmenta l'expressió de la quinasa NIK (NF- κ B quinasa induïble), aquesta proteïna també augmenta l'expressió de la IKK β [41], per tant, la major expressió es deguda a dos nivells, tan per les citocines com per la quinasa NIK. D'altra banda, el peròxid d'hidrogen (H₂O₂) també induïx la translocació de NF- κ B al nucli i per tant l'activació de l'expressió dels gens diana. En canvi, els agents antioxidants tenen un efecte inhibitori sobre la fosforilació de I κ B, per la qual cosa inhibeixen l'activació del NF- κ B [42].

El resultat obtingut al present treball evidencien un increment significatiu del NF- κ B després de l'exercici respecte a abans de realitzar-ho. Les dianes de NF- κ B són gens relacionats en la proliferació cel·lular, antioxidants, immunitat o gens antiapoptòtics. Entre els gens relacionats en la immunitat es troben gens que codifiquen les mateixes proteïnes que s'encarreguen de la activació del factor, és a dir, IL-1 β y TNF- α , així com gens que codifiquen altres citocines com el de l'interferó o la IL-6. També activa la síntesis de molècules de adhesió com la molècula d'adhesió intercel·lular (I-CAM), la molècula d'adhesió vascular (V-CAM) i la selectina-E [43]. A més augmenta l'expressió de la ciclooxigenasa 2 (COX2) i de l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) [44]. Tots aquests gens permeten que posi en marxa el procés d'inflamació ja que augmenten l'activació de mediadors moleculars de la inflamació i augmenten la permeabilitat vascular, així com el reclutament, activació i diferenciació de cèl·lules immunitàries [40].

Durant una sessió d'exercici moderat augmenta el consum d'oxigen entre vuit i deu vegades, per tal de satisfer els requeriments de la cèl·lula, ja que es produeix un metabolisme més intens per obtenir més energia. Aquest augment provoca que es generin més ROS, i per tant, s'han d'activar mecanismes de defensa antioxidant per tal de neutralitzar-los. Aquest fet queda evidenciat en el present estudi per una major expressió del gen de la catalasa després de l'activitat física [45-46]. De fet, l'expressió del gen de la catalasa es veu potenciat per l'acció del NF- κ B, de forma que l'augment en l'expressió d'aquest factor potser el responsable de l'augment del nivell del ARNm de la catalasa.

La catalasa és una hemoproteïna formada per 4 subunitats que es troba en major concentració en els peroxisomes seguida de la mitocondrial. La seva funció principal consisteix en convertir el H₂O₂, produït principalment a la cadena respiratòria mitocondrial i per la funció antioxidant de la superòxid dismutasa, en H₂O i O₂, com es mostra a continuació: H₂O₂ + CAT \rightarrow 2 H₂O + O₂ [47].

En el present estudi, es veu que l'augment de l'expressió del gen de la catalasa no ha estat significatiu, encara que tendeix a augmentar. L'explicació podria estar relacionada amb el fet que les nines que han participat estan entrenant unes 24

hores setmanals, de manera que el seu cos està molt entrenat i ben adaptat per fer front a l'augment de ROS associat a l'activitat física. A més, en un estudi s'ha evidenciat que l'entrenament disminueix la producció de H₂O₂ fins en un 40% [47-48].

La ciclooxigenasa o COX és un enzim que permet a l'organisme produir substàncies anomenades prostaglandines, a partir de l'àcid araquidònic (àcid gras poliinsaturat present als fosfolípids de les membranes cel·lulars, sobretot del múscul). Concretament catalitza la reacció: Araquidònic + AH₂ + 2 O₂ \rightleftharpoons Prostaglandina-H₂ + A + H₂O. És tracta d'una proteïna homodimèrica de membrana perifèrica amb un grup hemo en cada subunitat i que es situada a la membrana dels microsomes i del reticle endoplasmàtic. És inhibida pels antiinflamatoris no esteroides (AINEs) com l'aspirina. Existeixen tres isoformes d'aquest enzim, de les quals, la isoforma 2 és la que actua principalment en els processos inflamatoris. Aquest té com a funció intervenir en els processos d'inflamació i en la senyalització per prostanoïdes. L'expressió de la COX-2 es veu induïda per diversos mediadors inflamatoris (interferó γ , TNF- α , IL-1, factors de creixement, etc.) a diverses cèl·lules del sistema immune com són els monòcits i macròfags i també a cèl·lules endotelials [50].

L'expressió de COX-2 està generalment regulada a nivell transcripcional i post-transcripcional, encara que també pot ser regulada per la taxa de síntesi/degradació de la proteïna. El promotor de COX-2 humà conté múltiples llocs d'unió a factors transcripcionals, incloent l'element de resposta a cAMP i llocs d'unió per factors moleculars com la interleucina-6 (IL-6) i NF- κ B i per factors de creixement [51]. Així doncs, davant un procés inflamatori, algunes citocines i el NF- κ B activen l'expressió de la COX-2. Aquesta converteix l'àcid araquidònic en prostaglandines, les quals en el múscul esquelètic regulen la síntesi/degradació de proteïnes després de l'exercici i juga un paper necessari per a la correcta recuperació de les microruptures derivades de l'exercici al múscul esquelètic. Les prostaglandines estan involucrades en tots els processos que condueixen als signes clàssics de la inflamació: envermelliment, dolor i inflor [52].

Com es pot veure a la gràfica 1, hi ha hagut un augment de la COX-2 després de l'exercici respecte del control però aquest augment no ha estat estadísticament significatiu. Això es podria explicar pel fet que les nadadores estan ben entrenades, ja que l'estudi es va realitzar al mig de la temporada d'entrenaments. La pràctica d'exercici de forma regular i moderada, provoca tota una sèrie d'adaptacions reduint el grau de dany tissular i per tant del procés inflamatori associat a l'exercici. Aquest fet pot provocar l'increment de la COX-2 que s'ha observat no sigui significatiu. En definitiva, la producció de citocines proinflamatòries així com la resposta inflamatòria induïda per ROS, òxid nítric o COX2 es veu disminuïda ja que s'ha produït una adaptació de l'organisme a l'exercici [53]. Seria interessant poder comparar aquest resultats amb els que s'obtidrien a principi de temporada o comparar-los en persones no entrenades.

Finalment, els darrers paràmetres estudiats en les cèl·lules mononucleades són les interleucines. Durant l'exercici, la IL-6 és produïda per les fibres musculars a través d'una via TNF-independent. Aquesta interleucina estimula l'aparició d'altres citocines antiinflamatòries a la circulació, com ara IL-1ra i IL-10 i inhibeix la producció de citocines proinflamatòries com TNF- α i IL-1 β [11]. Aquest fet, evidenciat a les fibres musculars també s'observa a les cèl·lules mononucleades, el que suggereix que poden ser un model útil per estudiar la resposta inflamatòria induïda per l'activitat física. Recentment, la IL-6 es va presentar com la primera miocina, definida com una

citocina que es produeix i s'allibera mitjançant la contractació de les fibres musculars esquelètiques i sobretot, quan el glucogen intracel·lular és baix [54], exercint el seu efecte en altres òrgans del cos [55]. Durant una inflamació, la cascada de citocines consta de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1ra i IL-10. Les dues primeres que es produeixen en la cascada de citocines són TNF- α i la IL-1 [56], ambdues produïdes localment i amb una funció proinflamatòria. El TNF- α i la IL-1 estimulen la producció d'IL-6, que ha estat classificada com una citocina pro- i antiinflamatòria [57] depenent de si es produeix per un procés inflamatori patològic (proinflamatòria) o per l'activitat física (antiinflamatòria). La resposta de citocines en l'exercici difereix de la provocada per infeccions greus. El fet que les citocines proinflamatòries TNF- α i IL-1, en general no augmenten amb l'exercici indica que la cascada de citocines induïda per l'exercici és diferent notablement de la cascada induïda per infeccions [58]. En la Figura 3 s'observa que la resposta inflamatòria després d'una sessió d'exercici manca de citocines proinflamatòries. La IL-6 és la primera citocina present en la circulació durant l'exercici. El nivell de circulació d'IL-6 augmenta de manera exponencial (fins a 100 vegades) en resposta a l'exercici i va disminuint en el període post-exercici. Un altre fet en relació amb l'exercici, és que la IL-6 indueix la producció i alliberament de nivells circulants de citocines antiinflamatòries com ara la IL-1ra, TNF-R i IL-10 [59].

Pel que fa a la IL-6, un augment després de l'exercici es relaciona amb la intensitat del mateix, la durada, la massa de múscul, i en la capacitat de resistència. Una recerca dins dels últims anys ha demostrat que mRNA de la IL-6 està regulada positivament en la contractació de múscul esquelètic i que la taxa de la transcripció del gen d'IL-6 està notablement augmentada per l'exercici [60]. Adaptant el que s'ha comentat en les nostres gràfiques, podem veure que l'expressió IL-6 augmenta de forma significativa en les cèl·lules mononucleades ja que es veu una major expressió del gen, després d'haver fet l'exercici respecte d'abans. Per altra banda, la funció de la IL-10 com una molècula antiinflamatòria es va suggerir principalment per estudis que mostren la inhibició de la síntesi d'un ampli varietat de citocines proinflamatòries per diferents cèl·lules, en particular

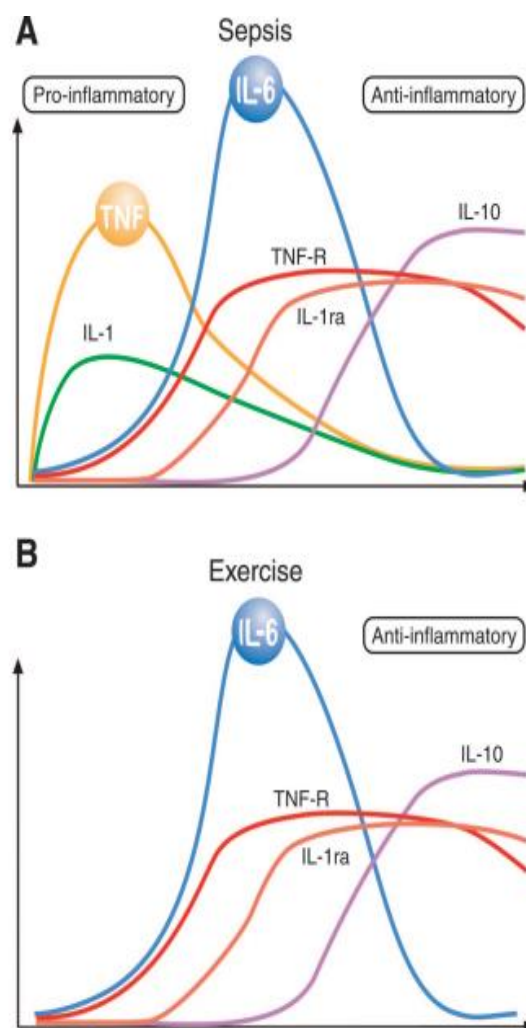


Figura 3: En la gràfica A, la cascada de citocines dins de les primeres hores associada a una situació de sèpsia consta de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-1ra, TNF-R, i IL-10. En canvi la gràfica B la mateixa resposta per associada a l'exercici no inclou TNF- α i IL-1, però mostra un marcat augment d'IL-6, que és

de l'estirp monocític [61]. Per tant, la IL-10 inhibeix la producció d'IL-1 α , IL-1 β , i TNF- α així com la producció de quimiocines. Aquestes citocines i quimiocines juguen un paper crític en l'activació de granulòcits, monòcits/macròfags, cèl·lules assassines cèl·lules NK, cèl·lules T i B i en el seu reclutament als llocs d'inflamació. En conjunt, aquestes observacions van suggerir que IL-10 juga un paper important en la regulació de la reacció inflamatòria que implica l'activació de macròfags/monòcits en particular [62]. En quant a l'expressió de la IL-10, es va veure augmentada en cèl·lules mononucleades. Una possible explicació de què l'augment no hagi estat significatiu és perquè l'activació del gen de la IL-10 per mitjà de la IL-6 no ha estat suficient elevada o bé que el temps des de la finalització de l'exercici fins que s'ha recollit la mostra no és suficient per evidenciar l'augment en la seva expressió. Finalment, de la mateixa manera que per la IL-10, la IL-1 β evidencia un petit augment en la seva expressió, que podria ser degut a petites microruptures causades per la natació, però no és significatiu, ja que com s'ha dit anteriorment, l'exercici activa una resposta antiinflamatòria, i les interleucines corresponents inhibeixen les interleucines proinflamatòries com és la IL-1 β , que té un paper rellevant en la resposta inflamatòria, i està implicat en una varietat d'activitats cel·lulars, incloent proliferació cel·lular, diferenciació i apoptosi [63].

CONCENTRACIÓ DE CITOCINES EN PLASMA DESPRÉS DE L'EXERCICI

Per estudiar la resposta inflamatòria en una sessió de natació també s'ha determinat la concentració en plasma de tres interleucines, la IL-6, IL-10 i la IL-1ra, les quals tenen un efecte antiinflamatori.

L'exercici físic intens i agut s'acompanya de respostes semblants a les que són induïdes per la infecció, sèpsia o traumatisme [3]. Es produeix un augment del nombre de leucòcits circulants (principalment limfòcits i neutròfils), la magnitud dels quals es relaciona tant amb la intensitat com amb la durada de l'exercici. També es produeixen augments en les concentracions plàsmiques de diverses substàncies amb influència en les funcions de leucòcits, que inclouen citocines inflamatores, com el TNF- α i IL-1; citocines antiinflamatòries IL-6, IL-10 i IL-1ra, i proteïnes de fase aguda, que inclouen la proteïna C reactiva (PCR). S'ha demostrat que un augment relativament petit dels nivells plàsmics d'IL-6 induïx augments de les dues citocines antiinflamatòries IL-1ra i IL-10. Durant l'exercici, l'augment de la IL-6 precedeix l'augment d'aquestes dues citocines, tot argumentant-se que la IL-6 pot ser la iniciadora d'aquesta resposta [64].

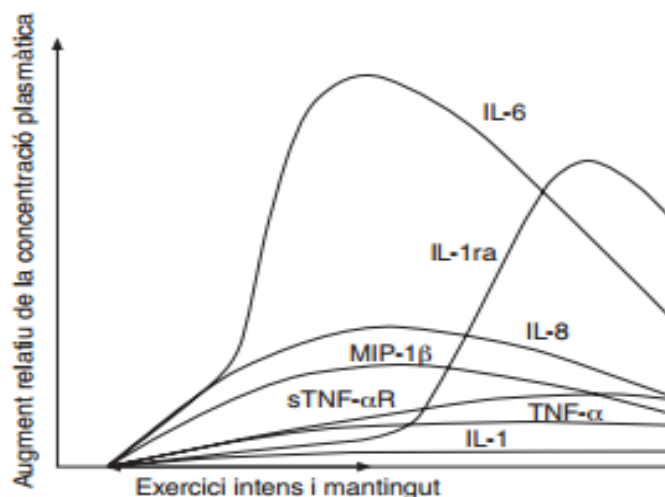


Figura 4: En aquesta gràfica es veu una relació entre el temps que es realitza exercici i la concentració plasmàtica de citocines.

En la figura 4 es pot veure que la IL-6 és la primera citocina en elevar-se i de forma molt marcada. A més, es pot veure que la concentració de les citocines proinflamatòries augmenten de forma molt discreta, la qual cosa pot ser deguda a l'efecte antiinflamatori de la IL-6. Quan es du un cert temps realitzant exercici, es veu un gran increment de la IL-1ra, degut a l'efecte de la IL-6. Aquesta imatge recolze el nostre estudi, ja que com es pot veure a la gràfica 2, la que fa referència a la concentració plasmàtica de la IL-6, hi ha una elevació significativa d'aquesta interleucina degut a l'exercici.

L'aparició d'IL-10 i IL-1ra en la circulació després de l'exercici també contribueix a la mediació dels efectes antiinflamatoris de l'exercici. Mentre que la IL-10 afecta a múltiples citocines, la funció biològica d'IL-1ra és inhibir la senyalització de la transducció a través del complex receptor d'IL-1 [65]. La IL-1ra és un membre de la família IL-1 que s'uneix als receptors d'IL-1, evitant que la IL-1 es pugui unir i dur a terme la seua funció pro-inflamatòria que consisteix en l'alliberació d'histamina en els mastòcits, produint vasodilatació i augmentar la permeabilitat vascular en el lloc de la inflamació [66]. En quan a la IL-10 i IL-1ra es veu que la concentració plasmàtica a ambdues ha augmentat després de l'exercici, com es pot observar a les gràfiques 3 i 4, perquè es produeix una resposta antiinflamatòria principalment. Però, la IL-10, a diferència de la IL-1ra, no ha estat un augment significatiu, la qual cosa es podria explicar pel fet que l'expressió de IL-10 és activada per IL-6, en canvi, l'expressió de IL-1ra és activada tan per IL-6 com per altres citocines com IL-10, per la qual hi ha una activació més forta [67]. Com a conseqüència de l'augment d'expressió, hi ha major concentració en circulació.

Un estudi evidencia que amb l'exercici s'augmenten les concentracions de IL-10 i IL-1ra, és a dir, recolze aquest estudi. El que es va fer en l'estudi va ser estudiar dos grups, un control introduint-hi una solució salina i un segon grup en qüestió, on a més de la solució salina s'introdueix una concentració de IL-6 semblant a la que és produïda durant l'exercici intens (al voltant de 140 pg/mL). Es va estudiar en plasma la concentració de IL-10 i IL-1ra després d'aquesta infusió i s'observa que la concentració havia augmentat tant sols quan també s'havia afegit IL-6 a la solució salina, demostrant així, que la IL-6, és el principal factor que activa la síntesis i alliberació de les citocines antiinflamatòries estudiades [68].

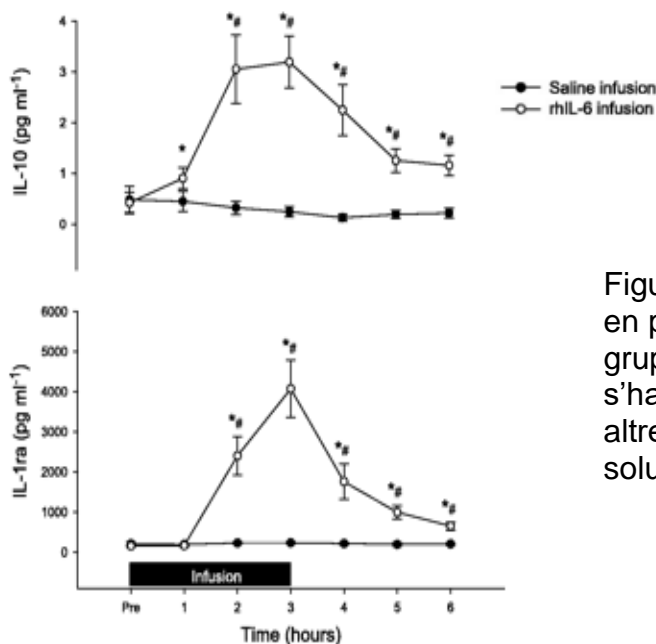


Figura 6. Concentració expressada en pg/ml de la IL-10 i la IL-1ra en dos grups diferents, un grup al qual s'havia inserit una solució salina i un altre al qual s'havia inserit una solució salina amb IL-6.

CONCLUSIÓ

Com a conclusió d'aquest treball, es podria dir que són varis els mecanismes que intervenen en una sessió de natació per fer front als danys produïts durant aquest exercici físic. Aquests mecanismes adaptatius inclouen un augment de la capacitat antioxidant de les cèl·lules mononucleades per eliminar l'excés de espècies reactives d'oxigen que es produeixen associada a l'exercici i un augment de la resposta pro i antiinflamatòria. La proinflamatòria s'activa per afavorir el procés de recuperació en front a les petites microruptures causades per la pròpia contracció muscular i la antiinflamatòria per evitar la inflamació sistèmica i tan sols es produeixi una inflamació local, que és la gran diferència que hi ha entre la sèpsia i l'exercici. Finalment, acabar dient que és important realitzar exercici de forma regular i moderada per adaptar el cos i així evitar una resposta inflamatòria a l'exercici de forma exagerada que pogués ser perjudicial pel cos i afavorir l'aparició de lesions.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B. Walsh, M. Tonkonogi, C. Malm, B. Ekblom, and K. Sahlin, "Effect of eccentric exercise on muscle oxidative metabolism in humans.," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 33, no. 3, pp. 436–41, Mar. 2001.
- [2] D. C. Nieman, D. A. Henson, L. L. Smith, A. C. Utter, D. M. Vinci, J. Mark Davis, D. E. Kaminsky, and M. Shute, "Cytokine changes after a marathon race."
- [3] N. I. Wiereszen, "Inmunidad en el Deporte," 2003.
- [4] I. Briceño, "Sepsis: Definiciones y Aspectos Fisiopatológicos."
- [5] P. D. Edward R. Sherwood, MD., "Current Concept of The Inflammatory response," 2002.
- [6] T. van der Poll, C. V. Keogh, X. Guirao, W. A. Buurman, M. Kopf, and S. F. Lowry, "Interleukin-6 Gene-Deficient Mice Show Impaired Defense against Pneumococcal Pneumonia," *J. Infect. Dis.*, vol. 176, no. 2, pp. 439–444, Aug. 1997.
- [7] B. K. Pedersen, A. Steensberg, and P. Schjerling, "Exercise and interleukin-6.," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 8, no. 3, pp. 137–41, May 2001.
- [8] D. C. Nieman and B. K. Pedersen, "Exercise and Immune Function," *Sport. Med.*, vol. 27, no. 2, pp. 73–80, 1999.
- [9] B. K. Pedersen and H. Bruunsgaard, "How physical exercise influences the establishment of infections.," *Sports Med.*, vol. 19, no. 6, pp. 393–400, Jun. 1995.
- [10] D. C. Nieman, "Exercise immunology: future directions for research related to athletes, nutrition, and the elderly.," *Int. J. Sports Med.*, vol. 21 Suppl 1, pp. S61–8, May 2000.
- [11] A. Marie, W. Petersen, and B. K. Pedersen, "The anti-inflammatory effect of exercise."
- [12] L. L. Ji, "Antioxidants and oxidative stress in exercise.," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 222, no. 3, pp. 283–92, Dec. 1999.
- [13] C. K. Sen, "Antioxidants in Exercise Nutrition," *Sport. Med.*, vol. 31, no. 13, pp. 891–908, 2001.
- [14] N. B. J. Vollaard, J. P. Shearman, and C. E. Cooper, "Exercise-Induced

- Oxidative Stress,” *Sport. Med.*, vol. 35, no. 12, pp. 1045–1062, 2005.
- [15] C. Groussard, F. Rannou-Bekono, G. Machefer, M. Chevanne, S. Vincent, O. Sergent, J. Cillard, and A. Gratas-Delamarche, “Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise.,” *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 89, no. 1, pp. 14–20, Mar. 2003.
- [16] M. A. Rodríguez-Martínez, E. C. García-Cohen, A. Briones, A. B. Baena, E. Marín, M. Salaices, and J. Marín, “Changes in plasma oxidative state with age and their influence on contractions elicited by noradrenaline in the rat tail artery.,” *Life Sci.*, vol. 65, no. 9, pp. 915–24, 1999.
- [17] U. S. Kayyali, C. Donaldson, H. Huang, R. Abdelnour, and P. M. Hassoun, “Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 17, pp. 14359–65, Apr. 2001.
- [18] J. M. Centeno, M. Orti, J. B. Salom, T. J. Sick, and M. A. Pérez-Pinzón, “Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices.,” *Brain Res.*, vol. 836, no. 1–2, pp. 62–9, Jul. 1999.
- [19] D. M. Pattwell, D. M. Patwell, A. McArdle, J. E. Morgan, T. A. Patridge, and M. J. Jackson, “Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 37, no. 7, pp. 1064–72, Oct. 2004.
- [20] M. D. Ferrer, A. Sureda, A. Mestre, J. A. Tur, and A. Pons, “The double edge of reactive oxygen species as damaging and signaling molecules in HL60 cell culture.,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 25, no. 2–3, pp. 241–52, 2010.
- [21] R. R. Jenkins, “Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review.,” *Int. J. Sport Nutr.*, vol. 3, no. 4, pp. 356–75, Dec. 1993.
- [22] M. M. Kanter, L. A. Nolte, and J. O. Holloszy, “Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 74, no. 2, pp. 965–969, 1993.
- [23] P. M. Clarkson and H. S. Thompson, “Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 72, no. 2 Suppl, p. 637S–46S, Aug. 2000.
- [24] D. J. Muñoz Marín Guillermo Olcina Camacho Rafael Timón Andrada Fco Javier Brazo Sayavera Dra María Concepción Robles Gil Marcos Maynar Mariño, “EJERCICIO FÍSICO Y ESTRÉS OXIDATIVO EXERCISE AND OXIDATIVE STRESS,” *Rev. Española*, pp. 93–107, 2010.
- [25] G. Barja, “Radicales libres y antioxidantes,” *Monogr. la Real Acad. Nac. Farm.*, vol. 0, no. 0, 1997.
- [26] X. Capó, M. Martorell, A. Sureda, I. Llompарт, J. A. Tur, and A. Pons, “Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells.,” *Eur. J. Nutr.*, vol. 54, no. 1, pp. 35–49, Feb. 2015.
- [27] L. Funes, L. Carrera-Quintanar, M. Cerdán-Calero, M. D. Ferrer, F. Drobnic, A. Pons, E. Roche, and V. Micol, “Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils’ oxidative stress in chronic exercise.,” *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 111, no. 4, pp. 695–705, Apr. 2011.
- [28] P. Tauler, A. Aguiló, I. Gimeno, E. Fuentespina, J. A. Tur, and A. Pons, “Response of blood cell antioxidant enzyme defences to antioxidant diet supplementation and to intense exercise,” *Eur. J. Nutr.*, vol. 45, no. 4, pp. 187–195, Jun. 2006.
- [29] A. Sureda, J. M. Batle, P. Tauler, A. Aguiló, N. Cases, J. A. Tur, and A. Pons,

- “Hypoxia/reoxygenation and vitamin c intake influence no synthesis and antioxidant defenses of neutrophils,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 37, no. 11, pp. 1744–1755, 2004.
- [30] J. A. Woods, J. M. Davis, J. A. Smith, and D. C. Nieman, “Exercise and cellular innate immune function.,” *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 31, no. 1, pp. 57–66, Jan. 1999.
- [31] la R. Licda Ana Victoria Mora Se agradece la revisión de la traducción Juan Manuel Sarmiento C, “Medicine & Science in Sports & Exercise ®,” *Am. Coll. Sport. Med. (MSSE)*, vol. 19, 1997.
- [32] Melbaalexandrahernández1, “FACTORESDERIESGOYPROTECTORESDE ENFERMEDADESCARDIOVASCULARESENPOBLACIÓN ESTUDIANTILUNIVERSITARIA.”
- [33] M. D. Ferrer, A. Sureda, J. M. Batle, P. Tauler, J. A. Tur, and A. Pons, “Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils,” *Free Radic. Res.*, vol. 41, no. 3, pp. 274–281, Jan. 2007.
- [34] A. Sureda, M. D. Ferrer, P. Tauler, I. Maestre, A. Aguiló, A. Córdova, J. A. Tur, E. Roche, and A. Pons, “Intense physical activity enhances neutrophil antioxidant enzyme gene expression. Immunocytochemistry evidence for catalase secretion,” *Free Radic. Res.*, vol. 41, no. 8, pp. 874–883, Jan. 2007.
- [35] atidgewell, “950 060 Human IL-10 ELISA kit insert V9.”
- [36] “Human IL-6 ELISA Kit.”
- [37] “Human interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) ELISA Kit.”
- [38] C. W. Müller, F. A. Rey, M. Sodeoka, G. L. Verdine, and S. C. Harrison, “Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA.,” *Nature*, vol. 373, no. 6512, pp. 311–7, Jan. 1995.
- [39] Y. Cao, G. Bonizzi, T. N. Seagroves, F. R. Greten, R. Johnson, E. V Schmidt, and M. Karin, “IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development.,” *Cell*, vol. 107, no. 6, pp. 763–75, Dec. 2001.
- [40] L. N. López-Bojorquez, “La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio,” *Rev. Investig. clínica*, vol. 56, no. 1, pp. 83–92.
- [41] J. D. Woronicz, “IB Kinase-: NF-B Activation and Complex Formation with IB Kinase- and NIK,” *Science (80-.)*, vol. 278, no. 5339, pp. 866–870, Oct. 1997.
- [42] A. S. Baldwin, “The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 14, pp. 649–83, Jan. 1996.
- [43] S. Ghosh, M. J. May, and E. B. Kopp, “NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 16, pp. 225–60, Jan. 1998.
- [44] S. F. Liu, X. Ye, and A. B. Malik, “Inhibition of NF- B Activation by Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents In Vivo Expression of Proinflammatory Genes,” *Circulation*, vol. 100, no. 12, pp. 1330–1337, Sep. 1999.
- [45] Z. Radak, H. Y. Chung, E. Koltai, A. W. Taylor, and S. Goto, “Exercise, oxidative stress and hormesis.,” *Ageing Res. Rev.*, vol. 7, no. 1, pp. 34–42, Jan. 2008.
- [46] A. Aguiló, P. Tauler, E. Fuentespina, J. A. Tur, A. Córdova, and A. Pons, “Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise.,” *Physiol. Behav.*, vol. 84, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2005.
- [47] J. Fernández, M. Da Silva-Grigoletto, and I. Túnez-Fiñana, “Estrés oxidativo inducido por el ejercicio,” *Rev. Andaluza Med. del Deport.*, vol. 02, no. 01, pp.

- 19–34, Mar. 2009.
- [48] “Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise | BenthamScience.” [Online]. Available: <http://www.eurekaselect.com/65367/article>. [Accessed: 26-May-2016].
- [49] F. De Farmacia, Y. Bioquímica, A. Carlos, E. Cabrera, G. Elsa, E. Robles, C. Asesora, E. Rafaela, and B. Rivera, “UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS,” 2010.
- [50] “Entradas sobre Ciclooxygenasas en Biota et Scientia.” [Online]. Available: <https://biotaetscientia.wordpress.com/tag/ciclooxygenasas/>. [Accessed: 27-May-2016].
- [51] S. Díaz Prado, A. Gallego Guadalupe, J. L. López-Cedrún, J. Ferreras Granado, and L. Antón Aparicio, “La ciclooxygenasa-2 (COX-2) y el factor de crecimiento epidérmico (EFG) en lesiones epiteliales orales premalignas,” *Rev. Española Cirugía Oral y Maxilofac.*, vol. 31, no. 3, pp. 170–181.
- [52] E. Ricciotti and G. A. FitzGerald, “Prostaglandins and inflammation.,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 5, pp. 986–1000, May 2011.
- [53] A. Abarca, “Ejercicio como tratamiento anti-inflamatorio,” *Med. Leg. Costa Rica*, vol. 33, no. 1, pp. 228–233.
- [54] A. Steensberg, M. A. Febbraio, T. Osada, P. Schjerling, G. van Hall, B. Saltin, and B. K. Pedersen, “Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content.,” *J. Physiol.*, vol. 537, no. Pt 2, pp. 633–9, Dec. 2001.
- [55] N. Hiscock, M. H. S. Chan, T. Bisucci, I. A. Darby, and M. A. Febbraio, “Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity.,” *FASEB J.*, vol. 18, no. 9, pp. 992–4, Jun. 2004.
- [56] C. A. Dinarello, “Interleukin-1 and tumor necrosis factor: effector cytokines in autoimmune diseases.,” *Semin. Immunol.*, vol. 4, no. 3, pp. 133–45, Jun. 1992.
- [57] J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John, “The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1813, no. 5, pp. 878–88, May 2011.
- [58] B. K. Pedersen and L. Hoffman-Goetz, “Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation,” *Physiol Rev*, vol. 80, no. 3, pp. 1055–1081, Jul. 2000.
- [59] B. K. Pedersen, A. Steensberg, and P. Schjerling, “Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects.,” *J. Physiol.*, vol. 536, no. Pt 2, pp. 329–37, Oct. 2001.
- [60] A. Steensberg, M. A. Febbraio, T. Osada, P. Schjerling, G. van Hall, B. Saltin, and B. K. Pedersen, “Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content.,” *J. Physiol.*, vol. 537, no. Pt 2, pp. 633–9, Dec. 2001.
- [61] M. Pretolani, “Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential,” *Clin. <html_ent glyph="@amp;" ascii="&"/> Exp. Allergy*, vol. 29, no. 9, pp. 1164–1171, Sep. 1999.
- [62] P. Wang, P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan, and M. M. Billah, “IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells.,” *J. Immunol.*, vol. 153, no. 2, pp. 811–6, Jul. 1994.
- [63] “IL1B interleukin 1 beta [Homo sapiens (human)].”
- [64] A. Córdova, “Els immunomoduladors davant la inflamació i el dany muscular originat per l'exercici,” *Apunt. Med Esport*, vol. 45, no. 168, pp. 265–270, 2010.

- [65] C. A. Dinarello, "The Role of the Interleukin-1–Receptor Antagonist in Blocking Inflammation Mediated by Interleukin-1," *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, no. 10, pp. 732–734, Sep. 2000.
- [66] "09 Citocinas y quimiocinas." [Online]. Available: <http://web.archive.org/web/20141230084028/http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema09/etexto09.htm>. [Accessed: 27-May-2016].
- [67] C. A. Dinarello, "Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist.," *Semin. Oncol.*, vol. 24, no. 3 Suppl 9, pp. S9–81–S9–93, Jun. 1997.
- [68] A. Steensberg, C. P. Fischer, C. Keller, K. Møller, and B. K. Pedersen, "IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 285, no. 2, pp. E433–7, Aug. 2003.