



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Resposta inflammatòria associada a la pràctica d'exercici físic regular

Catalina Melià Mesquida

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 78218038Y

Treball tutelat per Antonio Sureda Gomila
Departament de biologia fonamental i ciències de la salut

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Regular training; physical activity; anti-inflammatory effect; IL-6; TNF- α ; oxidative stress

Índex

<i>Abstract</i>	4
1. Objectius	6
2. Introducció	6
Procés inflamatori	6
Activitat física i salut	8
Exercici i inflamació	11
Exercici i estrès oxidatiu	13
Envel·liment saludable.....	14
3. Materials i Mètodes	17
Descripció general de l'estudi.....	17
Individus estudiats.....	17
Tècniques utilitzades	18
Anàlisi estadístic	19
4. Resultats	19
5. Discussió	21
6. Conclusions	25
7. Referències	26

Abstract

La pràctica d'activitat física regular té efectes beneficiosos sobre l'estat de salut de les persones disminuint el risc de patir malalties inflammatòries cròniques. Amb aquest estudi es pretén fer una revisió sobre els mecanismes pels quals l'exercici físic influeix de forma positiva sobre aquest aspecte i veure-ho reflectit en els marcadors bioquímics inflamatoris i de dany oxidatiu. Per això s'han fet diverses determinacions (IL-6, TNF- α , CD62L o L-selectina i MDA) en individus sedentaris i actius d'ambdós sexes. Els resultats obtinguts indiquen que hi ha diferències significatives segons el grau d'activitat física i entre gèneres. En el cas de IL-6 i MDA els individus inactius presenten nivells més elevats d'aquests marcadors, a més, en el cas de MDA també s'observen diferències significatives entre gèneres, presentant nivells superiors els homes que les dones. Ara bé, després d'haver analitzat el TNF- α i la L-selectina, no es veuen canvis significatius. La dinàmica que segueix és que una sessió d'activitat física desencadena un pic de IL-6 que estimularia la secreció de més citocines antiinflamatòries i que a la llarga disminuirien els nivells basals de marcadors inflamatoris. Per altra banda, l'exercici físic també s'associa a nivells elevats d'espècies reactives d'oxigen que poden produir dany cel·lular, però nivells moderats poden tenir un paper regulador potenciant els sistemes antioxidants. En conclusió, la pràctica regular d'exercici físic al llarg de la vida afavoreix un millor perfil antiinflamatori i antioxidant.

The practice of regular physical activity has beneficial effects on the health of individuals by reducing the risk of chronic inflammatory diseases. In this study it is reviewed the mechanisms by exercise affects this aspect, and it is analysed the biochemical markers of inflammation and oxidative damage. To do this, various determinations (IL-6, TNF- α , CD62L or L-selectin and MDA) had been studied in sedentary and active people. The results indicate that there are significant differences between these two groups and gender. In the case of IL-6 and MDA, inactive individuals have higher levels of these markers. It is also in the case of MDA significant differences between genders, presenting higher levels at men than women. Nevertheless, TNF- α and L-selectin are not presenting significant changes. The fact is a session of physical activity triggers a peak of IL-6, which stimulates the secretion of anti-inflammatory cytokines. This eventually decreases the baseline levels of inflammatory markers. Moreover, physical exercise is also associated with elevated levels of reactive oxygen species, which can cause cellular damage. However, low levels of ROS may have a regulatory role increasing antioxidant systems. In conclusion, the practice of regular exercise training leads to the formation of an anti-inflammatory and antioxidant profile.

1. Objectius

El present estudi es centra en dos grans objectius principals:

- Avaluar si la pràctica regular d'activitat física comporta millores a marcadors bioquímics relacionats amb la inflamació i de dany oxidatiu.
- Observar si hi ha diferències de gènere entre persones físicament actives i persones inactives o sedentàries als mateixos paràmetres bioquímics.

2. Introducció

Procés inflamatori

De forma general es podria definir la inflamació com la resposta defensiva de l'organisme en front a una agressió focal. Aquesta situació posa en marxa tota una sèrie de mecanismes als teixits afectats que van dirigits a 1) augmentar el flux de sang als vasos de la zona afectada, 2) augmentar la permeabilitat dels capil·lars per facilitar la sortida dels elements necessaris per fer front a l'agressió i, 3) atreure al teixit els elements defensius necessaris, principalment neutròfils i monòcits.

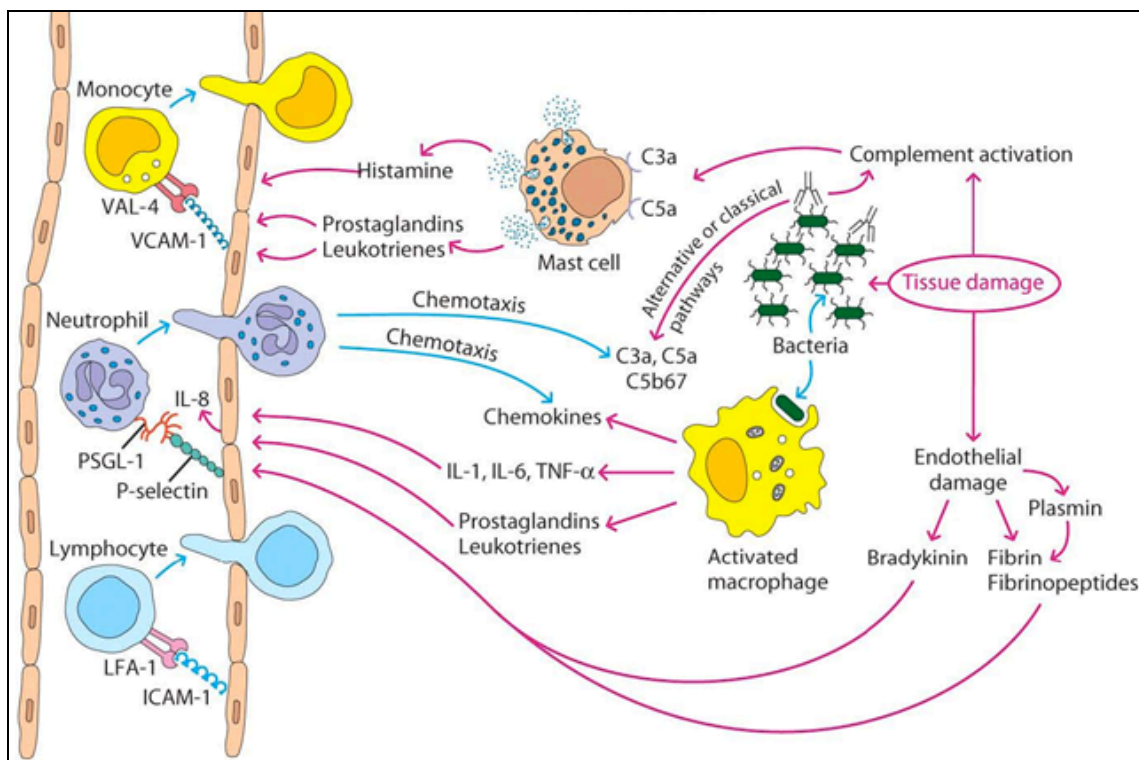


Figura 1. Procés inflamatori on es veu la participació dels leucòcits i les citocines que intervien¹.

El procés inflamatori es troba altament regulat per tota una sèrie de mediadors entre els quals destaquen les molècules d'adhesió, quimio/citocines (histamina, interleuquina (IL)), productes de sistemes enzimàtics plasmàtics (plasmina, bradicina) i per mediadors vasoactius (prostaglandina) alliberats pels leucòcits, mastòcits i plaquetes. Les citocines IL-1, IL-6, IL-8 (quimiotàctica) són produïdes per les cèl·lules tissulars en les primeres fases de la inflamació. Després, quan ja acudeixen els leucòcits, aquests alliberen IL-1, IL-4, Factor de Necrosi Tumoral (TNF) i interferó gamma (IFN), que estimulen la migració cel·lular (Figura 1).

Una de les etapes essencials en la inflamació és l'arribada al punt danyat de cèl·lules immunitàries. Alguns dels mediadors de inflamació alliberats pel teixit danyat atreuen a les cèl·lules immunitàries, procés de quimiotaxis, per que una vegada al lloc afectat puguin exercir les seves funcions específiques dins el procés. De les cèl·lules immunitàries, els neutròfils són els primers en arribar i en actuar. Un dels mediadors necessaris per la correcta evolució del procés és la molècula d'adhesió L-selectina (CD62L o LECAM) que intervé a l'etapa del *rolling* de les cèl·lules perquè es disminueixi la velocitat del seu transport i puguin procedir a la migració cap al lloc afectat. CD62L és expressada tant per neutròfils, monòcits, certs subgrups de limfòcits T i B, com cèl·lules NK o l'endoteli. Aquesta proteïna transmembranal d'adhesió es troba a la superfície de les cèl·lules per poder interaccionar amb altres glicoproteïnes i així regular aquests lligams entre els leucòcits i l'endoteli a la zona inflamada². A més, CD62L és un marcador de risc cardiovascular (CV)³. La família de les selectines engloba la E-, L- i P-selectina, on els gens que les codifiquen es troben en tàndem en el cromosoma 1, en el cas dels humans⁴. S'ha vist en ratolins deficients en L-selectina que el reclutament de leucòcits a la zona inflamada no és tan eficient, suggerint que aquesta proteïna d'adhesió té una funció important en el procés inflamatori⁵.

La IL-6 és un dels marcadors inflamatoris més estudiats ja que participa en la regulació de la resposta immune, i que intervé en la reacció de fase aguda⁶. Normalment, no és sintetitzada per les cèl·lules de forma contínua, però la seva expressió és activada per altres citocines (TNF- α i IL-1) o per certes infeccions⁷. Les cèl·lules que la secreten són

els macròfags, limfòcits T, cèl·lules endotelials i fibroblasts. Recentment s'ha vist que el múscul també n'allibera en resposta a l'estímul de la contracció muscular. Ha estat un gran avanç considerar el múscul com a òrgan endocrí⁸ però encara falta per demostrar exactament quin és el mecanisme pel qual és alliberada pel múscul i realitza la seva funció. La informació trobada fins ara apunta a la hipòtesi de que actuaria com una hormona catabòlica, estimulants la mobilització de substrats extracel·lulars i augmentant el seu transport durant l'exercici⁹. La IL-6 exerceix diversos efectes sobre l'organisme, depenent del teixit diana, com l'activació o inhibició de la proliferació, la diferenciació cel·lular, etc. Concretament, promou l'expressió de la IL-2 i el seu receptor, la proliferació i diferenciació dels limfòcits T, la diferenciació de macròfags, etc¹⁰. També es pensa que seria un marcador del síndrome metabòlic, però no una causa. La IL-6 fa que apareguin a la circulació més citocines antiinflamatòries com la IL-1ra o la IL-10, inhibint així les citocines proinflamatòries com el TNF- α . D'aquesta manera també es redueix el risc a patir resistència a la insulina (RI).

El TNF- α és produït i secretat majoritàriament pels adipòcits i el seu augment es relaciona amb la RI i en un augment en la taxa d'apoptosi dels adipòcits. També afavoreix una major secreció d'àcids grassos, la qual cosa es relaciona amb major risc d'aterosclerosi i inflamació sistèmica crònica de baix grau¹¹. El TNF- α , també és secretat pels monòcits i macròfags, actuant com a regulador de la resposta immune mitjançant diverses funcions i a més, és un potent pirogen¹². Circula pel sistema sanguini en resposta a un estímul d'agents infecciosos o dany tissular, estimulants a neutròfils i alterant el perfil de les cèl·lules endotelials. La producció de TNF- α és regulada per l'acció de limfocines i endotoxines alliberades pels macròfags i l'IFN també augmenta la seva secreció.

Activitat física i salut

El concepte de salut es podria definir com un estat de benestar físic, mental i social complet i no només l'absència de malaltia o discapacitat¹³. Un dels aspectes a considerar dins aquest concepte és la pràctica d'exercici, ja que la seva pràctica regular suposa un benefici per la salut. És cert que l'activitat física té molts d'efectes favorables sobre l'organisme, ara bé, sempre que es planifiquin correctament, perquè si es fa una mala pràctica, els efectes poden ser perjudicials.

L'exercici provoca una resposta immunitària de fase aguda semblant a la que es produeix davant una infecció i que és proporcional a la durada i a la intensitat del mateix. Es diferencien diversos tipus d'activitat física, des de la pràctica regular i moderada fins l'aguda extenuada. L'entrenament que segueixen els atletes és un estil de vida que pot influir en la funció del sistema immune, la salut i finalment la millora de l'exercici. La idea per desenvolupar un entrenament per mantenir la salut del sistema immunitari és començar amb un programa senzill, amb una intensitat i durada moderada. S'ha d'anar seguint un augment periòdic del volum d'entrenament i afegir diversos tipus d'exercicis per tenir varietat. S'han d'evitar entrenaments excessius i massa forts perquè poden ser perjudicials i facilitar el desenvolupament de malalties. Per això s'ha d'assegurar un bon descans, que estigui ben planificat i que sigui suficient. En conjunt es pot integrar-ho tot en un programa per identificar signes que demostrin una millora de l'estat amb l'entrenament o si hi ha manifestacions de deteriorament d'estrès físic¹⁴.

La pràctica d'activitat física moderada i regular augmenta la resistència a les infeccions i potencia el benestar físic i emocional. En canvi, si es tracta d'un exercici extenuat provoca una suspensió temporal de la funcionalitat cel·lular i augmenta el risc a patir infeccions de les vies respiratòries. És el que es coneix com la relació en "J" entre la incidència de infeccions i l'activitat física (Figura 2). La causa d'aquesta disminució del

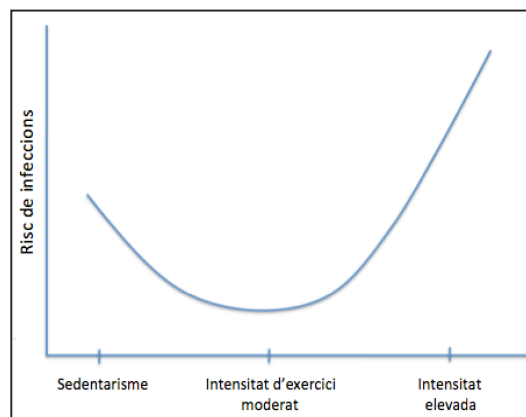


Figura 2. Gràfica que relaciona el grau d'activitat física amb el risc de patir infeccions.

El sistema immune sembla estar relacionada amb l'elevada circulació d'hormones d'estrès i les alteracions del balanç de citocines proinflamatòries i antiinflamatòries en resposta a l'exercici. També s'ha vist que un exercici excessiu causa dany als diferents components cel·lulars (lípid, proteïnes i ADN) i fins i tot induir l'apoptosi.

Es pretén plantejar l'activitat física com un mecanisme antiinflamatori i de forma indirecta, interferir sobre diverses patologies cròniques, com el síndrome metabòlic o patologies CV, disminuint el risc de presentar-les. S'ha vist que la realització d'exercici regular ofereix protecció en contra l'arteriosclerosi, *diabetis mellitus* de tipus 2 (DMT2), càncer de colon, isquèmica o infart cardíac, i malaltia pulmonar obstructiva crònica¹⁵. El que tenen en comú totes aquestes patologies és que estan associades amb un perfil inflamatori crònic¹⁶. Les evidències suggereixen que l'efecte protector de l'exercici possiblement sigui pels efectes antiinflamatoris que promou la seva pràctica regular mitjançant la reducció de la massa adiposa abdominal i per la creació d'un entorn antiinflamatori¹⁷.

Un estil de vida poc saludable (no seguir una dieta equilibrada, sedentarisme o seguir mals hàbits) fa que s'acumulin més lípids al teixit adipós, pel fet de que la ingesta és superior a les necessitats energètics. Un augment del teixit adipós estimula que migrin cèl·lules immunes cap aquest teixit, pel fet de que els adipòcits estan amb un major grau d'hipòxia i això provocarà que expressin i alliberin tota una sèrie de citocines que faran augmentar el nivell basal de l'estat inflamatori de tot l'organisme (Figura 3). L'exercici ajuda a prevenir aquest excés de lípids, actuant de forma directa augmentant la despesa energètica i a més, promou una millora de la salut CV afavorint el perfil lipídic de la sang (\downarrow LDL/ \uparrow HDL) i així disminuir el risc de formació de plaques d'ateroma. Finalment, si s'exerceix activitat física regular, ajuda a mantenir un ambient antiinflamatori per prevenir diverses malalties cròniques¹⁸.

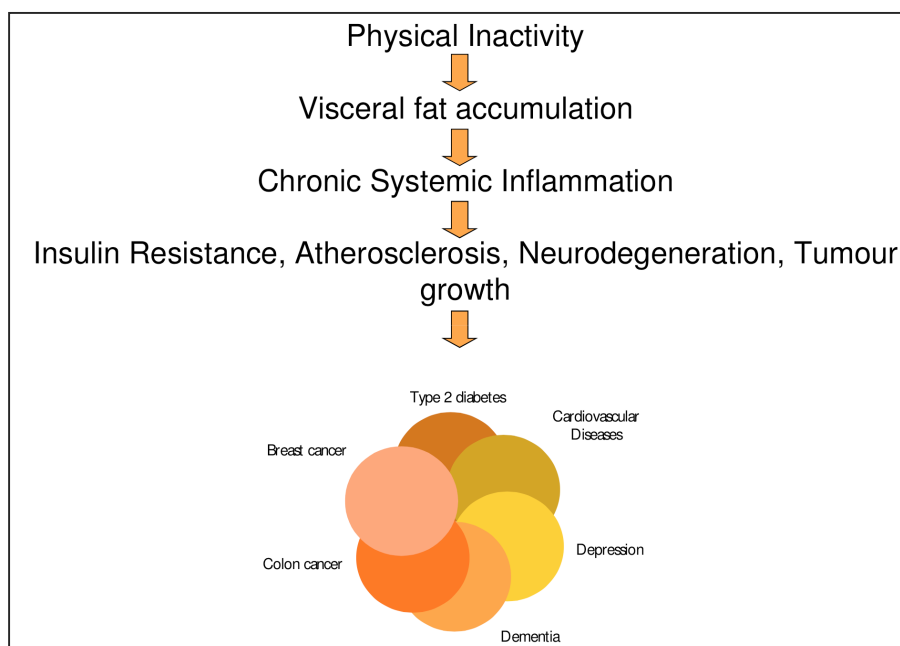


Figura 3. Cadena d'efectes que suposa la inactivitat física¹⁷.

Exercici i inflamació

Parlant del paper que té l'exercici en el procés de inflamació, es podria definir activitat física com la realització de qualsevol moviment que suposi un esforç muscular i que tingui repercussions a tot l'organisme, ja sigui el moviment de metabòlits energètics (glucogen, triglicèrids) o canviant el perfil metabòlic (catabolisme)¹⁹. Es sol fer la distinció entre activitat física i exercici, sent aquest darrer una part concreta de l'activitat física. Ara bé, a aquest treball es tractaran aquests dos conceptes com equivalents ja que en general venen a referir-se al mateix.

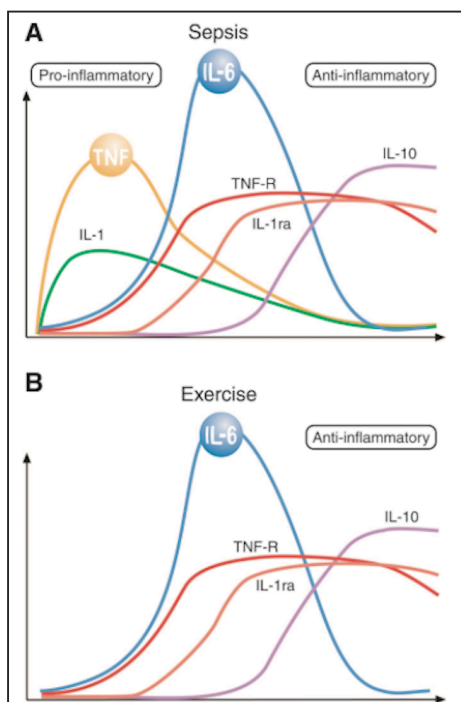


Figura 4. Diferències en l'alliberació de citocines en el procés de sèpsia (A) i d'exercici (B)⁹.

Els efectes de l'exercici físic relacionats amb la inflamació es produeixen per diversos mecanismes, on els principals marcadors són les citocines, concretament la IL-6 i el TNF- α . La resposta local a les infeccions o als danys tissulars consisteix en la producció de citocines que són alliberades al lloc de la inflamació (Figura 4). Algunes d'aquestes citocines faciliten la migració de limfòcits, neutròfils, monòcits i altres cèl·lules. La resposta inflamatòria local és acompanyada per una resposta sistèmica coneguda com la resposta de fase aguda. En resposta a una infecció aguda o trauma, les citocines i els inhibidors augmenten fins que se supera la patologia i llavors els seus nivells retornen al

nivell basal⁹. La resposta de les citocines durant l'exercici és diferent a la d'una infecció, ja que les citocines proinflamatòries TNF- α i IL-1b, en general no augmenten amb l'exercici²⁰⁻²³. Ara bé, la IL-6 augmenta exponencialment i disminueix una vegada que ja ha passat l'estímul que requereix una demanda energètica superior. Per altra banda, durant l'exercici també s'ha trobat un augment dels marcadors antiinflamatoris (IL-10, IL-1ra i sTNF-R) i una inhibició de TNF- α , creant així un ambient antiinflamatori favorable²⁴. S'ha vist que l'exercici fa alliberar petites quantitats d'adrenalina que també atenuarien l'aparició de TNF- α . Diversos estudis mostren com marcadors

inflamatoris disminueixen si augmenta l'activitat física⁹. Sembla ser que la causant de tot és la IL-6, que estigui en circulació serà el punt clau per activar a les altres citocines^{25,26}. Es produeix un increment dels nivells circulants de IL-6, sense un dany muscular evident⁹, en funció de la intensitat i durada de l'exercici, la massa muscular implicada i l'entrenament de l'individu²⁰⁻²². S'ha demostrat que l'ARNm de la IL-6 és activat per la contracció del múscul esquelètic i la transcripció del gen millora amb l'exercici. Aquest fet es veu pronunciat per la pràctica d'activitat moderada i regular²⁷.

Les citocines i altres pèptids que són sintetitzats i alliberats per les fibres musculars, poden exercir un efecte paracrí o endocrí, per això la forma més correcta de classificar-les seria com a miocines²⁸. Les miocines poden actuar directament sobre el metabolisme lipídic i alhora produir un efecte indirecte sobre els procés antiinflamatori. A més, influeixen de forma directe sobre els efectes antiinflamatoris estimulants la producció dels seus components. Es postula que la contracció del múscul esquelètic és l'estímul que fa alliberar les miocines que actuen com a hormones de forma específica i local, sobre el teixit adipós o el propi múscul esquelètic, interferint en les vies de l'oxidació lipídica potenciant la seva activitat. La primera miocina identificada com a tal i la més estudiada és la IL-6. S'allibera en resposta a la contracció muscular, per l'augment de la concentració de calci citosòlic, i també activa els factors de transcripció positius del seu propi gen²⁹. Aquest fet fa que el múscul esquelètic sigui únic perquè pot secretar IL-6 independentment del TNF- α . La IL-6 també estimula l'alliberació de la IL-10 i de la IL-1ra que són potents citocines antiinflamatòries perquè inhibeixen l'alliberació de diversos mediadors proinflamatoris. Quan es troba dins de la cèl·lula participa en les funcions del teixit muscular i quan és alliberada a la circulació, actua com una hormona sobre diversos òrgans.

En el múscul, actua sobre la via de senyalització fosfatidilinositol-3-quinasa

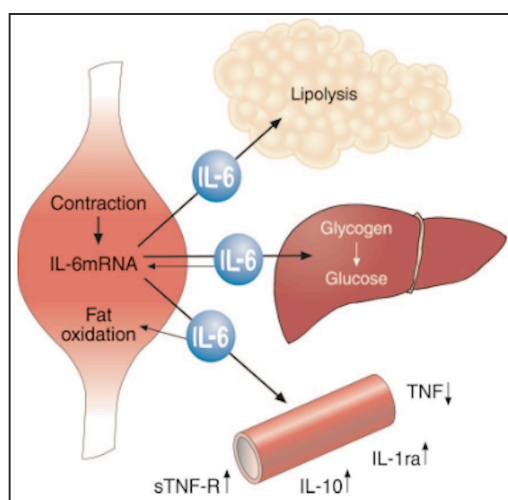


Figura 5. Efectes de la IL-6 sobre diferents teixits (muscular, adipós, hepàtic i vascular).

(PI3K) i les proteïnes quinases activades per mitogen (AMPK), de forma que les activa perquè així es pugui captar més glucosa. Els efectes que té la IL-6 sobre el fetge i el teixit adipós (Figura 5) són regulats per l'activació de la AMPK.

La IL-15 és una altra miocina que també s'expressa en el múscul esquelètic i s'ha identificat com un factor de creixement que estimula els processos anabòlics, que també té efectes sobre el metabolisme lipídic. Es pensa que podria ser una connexió entre el múscul i el teixit adipós. S'ha vist que els nivells del seu mRNA en el múscul augmenten amb l'entrenament suposant que augmenta la seva concentració en el múscul. Es va veure en un estudi amb rates que la IL-15 contribuïa a la disminució de la massa del teixit adipós abdominal però no semblava tenir efecte sobre el subcutani³⁰.

Exercici i estrès oxidatiu

La pràctica d'activitat física regular, a pesar de tenir diversos efectes beneficiosos, és considerat com l'estímul que indueix més estrès oxidatiu. Hi ha certa controvèrsia pel que fa aquest tema ja que diversos estudis antics s'han centrat en els efectes adversos de la generació de radicals lliures d'oxigen (ROS) en el múscul. En canvi, actualment certs estudis consideren que la producció mitocondrial de ROS pel múscul durant l'exercici és necessari perquè les vies de senyalització s'adaptin a aquest nou estímul. A més, es proposa que alguns efectes positius que promou l'exercici estan relacionats en la producció de ROS, com que pot promoure la sensibilitat a la insulina i ajudar a prevenir la DMT2. La inducció de ROS per l'exercici activa les vies de senyalització redox i modula el sistema antioxidant endogen. Aleshores, avui en dia són considerats tant els aspectes beneficiosos com perjudicials de la seva generació. Aquesta contradicció fa plantejar si seria favorable la suplementació d'antioxidants durant l'exercici i quin efecte tindria sobre un programa d'entrenament regular.

Durant l'exercici físic, el flux d'oxigen augmenta per fer front a la demanda energètica del múscul, la qual cosa suposa un augment significatiu de la producció de ROS i radicals lliures (RL) a la cadena respiratòria mitocondrial. Aquestes molècules actuen sobre altres macromolècules, especialment l'ADN, lípids i proteïnes. Com que augmenta el metabolisme i el consum d'oxigen per les fibres musculars, augmenta la

temperatura i disminueix el pH de les cèl·lules musculars durant l'exercici i això fa que s'acceleri més la producció de RL. Encara que la major part de la generació de ROS es produeix principalment en els músculs, també es dona a algunes cèl·lules immunitàries, com els macròfags, monòcits, eosinòfils i neutròfils. Els RL generats durant l'activitat física activen alguns components importants del sistema de defensa antioxidant com els enzims antioxidants catalasa, superòxid dismutasa i la glutatió peroxidasa. En altres paraules, l'activitat física pot ser que tingui un efecte final antioxidant.

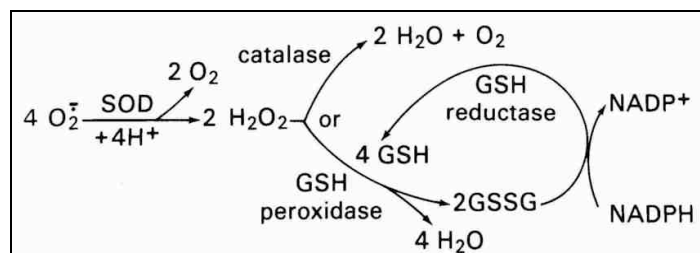


Figura 6. Principals espècies reactives d'oxigen i enzims antioxidants. SOD, superòxid dismutasa; GSH, glutatió reduït; GSSG, glutatió oxidat

L'activitat física aguda i la regular tenen efectes diferents sobre l'estrès oxidatiu. Diversos estudis evidencien que l'exercici agut indueix la producció de ROS i espècies reactives de nitrogen, i per tant estrès oxidatiu. En canvi, l'exercici regular indueix el sistema antioxidant endogen que confereix protecció en contra dels efectes adversos del dany oxidatiu. Estudis recents indiquen que la producció de ROS durant l'exercici és un iniciador de l'activació de dues vies de senyalització redox importants, la del factor nuclear κ B (NF- κ B) i la AMPK. L'activació d'aquestes dues vies indueix certs enzims antioxidants com la superòxid dismutasa mitocondrial o la glutatió peroxidasa. El seguiment dels efectes a llarg termini han mostrat que el contingut de glutatió reduït augmenta, com també augmenta l'activitat de la catalasa³¹.

Envelliment saludable

L'envelliment és un procés fisiològic on es donen una sèrie de canvis estructurals i funcionals de forma gradual i no s'ha de confondre amb una malaltia, ja que comença en el moment del naixement. S'han proposat diversos mecanismes per explicar l'envelliment però les teories més recents es centren en dos processos relacionats entre si: l'existència d'un programa genètic determinat i els efectes de l'exposició

continuada a factors exògens que donen lloc a l'acumulació progressiva de lesions cel·lulars i moleculars. També se sap que les cèl·lules dels animals superiors en cultiu experimenten un nombre limitat de divisions cel·lulars. És el que es coneix com a fenomen de Hayflick (potencial de duplicació finit). A cada divisió cel·lular es produeix l'escurçament dels telòmers dels cromosomes i existeixen evidències sòlides que demostren que les cèl·lules expressen el fenotip senescent quan un o més dels seus telòmers arriba a una longitud crítica. L'acumulació de cèl·lules senescentes que no es divideixen pot comprometre la renovació i la reparació dels teixits, a més de que aquestes alliberen senyals senescentes (IL, factors de creixement) que alteren el microambient del teixit podent modificar la seva estructura i funció.

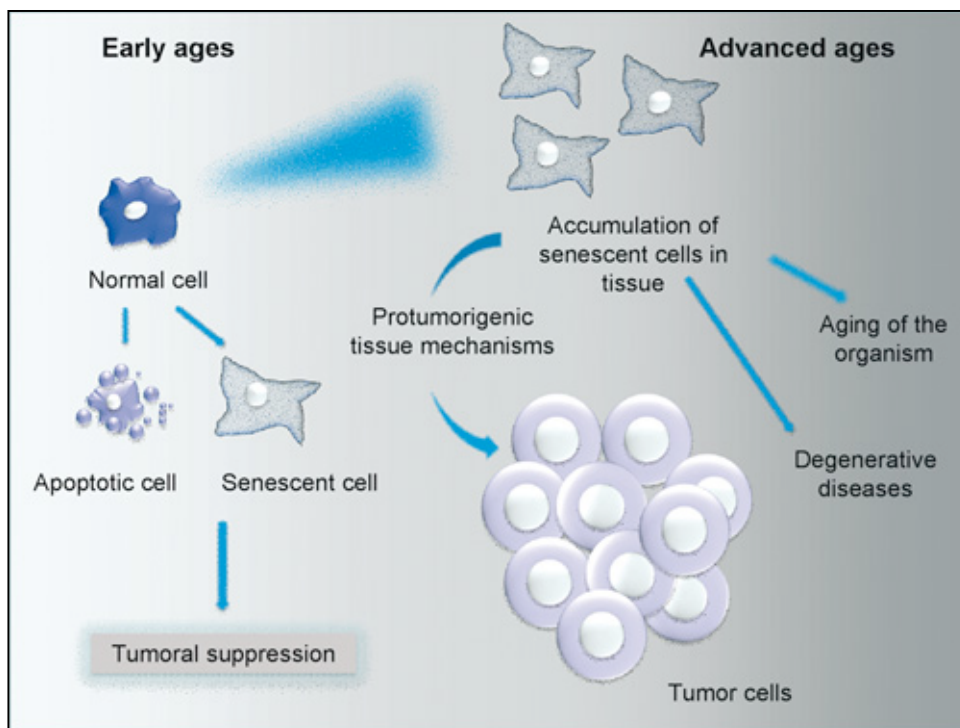


Figura 7. Diferències dels mecanismes senescentals en cèl·lules d'edat primerenca i avançada⁵⁰.

Segons la Organització Mundial de la Salut, l'envelliment actiu comporta aprofitar al màxim les oportunitats per obtenir un benestar físic, psíquic i social al llarg de tota la vida. L'objectiu final seria estendre la qualitat, la productivitat i l'esperança de vida en edats avançades.

L'envelliment provoca una disfunció de les capacitats del sistema immune, els òrgans i els teixits que de forma progressiva es van deteriorant i van perdent la seva

funcionalitat. A mesura que avança l'edat, les accions realitzades per ROS passen a ser més perjudicials, ja que amb l'envelliment els mecanismes antioxidants van disminuint i per tant hi ha major probabilitat de que les espècies radicalàries actuïn sobre diversos components cel·lulars. A més, s'ha apreciat que els ancians presenten elevades concentracions de citocines proinflamatòries de forma basal i s'ha comprovat que quantitats apropiades d'activitat física poden disminuir aquest nivell de citocines. D'aquesta manera, s'aconsegueix controlar els nivells d'aquests marcadors, sent així un aspecte beneficiós per l'envelliment¹⁷.

Els sistemes de reparació de l'ADN van disminuint amb el temps i per tant, es van acumulant més mutacions que al final es tradueixen en la síntesi de proteïnes anormals que acabaran compromentent a la cèl·lula. Una altra molècula important que es veu afectada és el col·lagen, ja que forma part de la matriu extracel·lular i participa en l'intercanvi de substàncies intercel·lular. Amb el pas del temps es provoquen més danys que perjudiquen la integritat d'aquesta estructura alterant les funcions fisiològiques en les quals hi participen.

A aquest estudi es pretén veure quin és l'efecte antiinflamatori associat a la pràctica d'activitat física regular i alhora, estudiar quines són les variacions en els marcadors inflamatoris. Per aquest motiu s'han dut a terme una sèrie de determinacions que s'han realitzat sobre individus d'edat avançada, al voltant dels 65 anys, per això s'introdueix aquest procés en l'envelliment.

3. Materials i Mètodes

Descripció general de l'estudi

El present estudi es troba inclòs dins un estudi cross-seccional que consisteix en l'avaluació de marcadors dietètics, activitat física i rendiment esportiu, defenses antioxidants i dany oxidatiu. Al global de l'estudi hi participaren un total de 380 persones, 176 homes de 55-80 anys i 204 dones de 60-80 anys. Les persones seleccionades per l'estudi no presentaven cap indicati de patologia cardiovascular documentada prèvia a la participació a l'estudi. Tot l'estudi s'ha dut a terme d'acord a les guies reglades a la declaració de Helsinki, i tots els procediments van ser aprovats pel comitè d'ètica d'investigació clínica de les Illes Balears. Tots els participants a l'estudi van ser informats adequadament del mateix i van subscriure un consentiment informat per participar. El grau d'activitat física es va mesurar per mitjà del qüestionari Minnessota, validat per la població espanyola, i va permetre classificar els diferents participants en funció del grau d'activitat física realitzada^{32, 33}.

Individus estudiats

Pel desenvolupament d'aquest treball es van utilitzar quatre grups d'estudi, de 20 individus cada un. Es diferencien entre gèneres i segons el seu grau de pràctica regular d'activitat física (si són actius o inactius). Aleshores els grups resultants són: homes actius, homes inactius, dones actives i dones inactives. Es van incloure en l'estudi tots aquells homes entre 55 i 80 anys, i dones entre 60 i 80 anys sense malaltia CV documentada. Les característiques generals dels participants en l'estudi es mostren en la Taula 1.

	Homes (n=40)		Dones (n=40)	
	Inactius (n=20)	Actius (n=20)	Inactius (n=20)	Actius (n=20)
Edat (anys)	64.8 ± 1.2	65.0 ± 1.2	68.2 ± 1.0	66.8 ± 0.9
Pes (kg)	85.1 ± 2.5	73.5 ± 2.0*	66.5 ± 1.8	65.5 ± 2.0
Alçada (cm)	170.9 ± 1.3	168.1 ± 1.1	156.3 ± 1.0	155.7 ± 0.9
IMC (kg/m ²)	29.0 ± 0.6	26.0 ± 0.7*	27.2 ± 0.7	27.0 ± 0.8
Greix corporal (%)	28.4 ± 0.8	23.2 ± 1.1*	38.2 ± 0.9	36.2 ± 1.2
ICC (cm)	101.5 ± 1.8	89.6 ± 2.2*	86.3 ± 1.4	83.7 ± 1.8
ICA	0.59 ± 0.01	0.53 ± 0.01*	0.55 ± 0.01	0.54 ± 0.01
Activitat física (METs)	1561 ± 116	9764 ± 287*	1667 ± 133	8143 ± 334*

Taula 1. Dades antropomètriques dels participants dels diferents grups. Els valors són presentats com la mitjana ± SEM. Les diferències significatives entre els subjectes inactius i actius es van analitzar amb un t-test desaparellat. Les diferències del greix corporal entre individus inactius i actius es van avaluar amb un χ^2 test. (Abreviacions: IMC, índex de massa corporal; ICC, índex cintura/maluc ; ICA, índex cintura-alçada).

Tècniques utilitzades

Determinació de IL-6, TNF α i CD62L

Es van disposar prèviament d'un recull de mostres que es mantien congelades a -75°C . Es van fer tres determinacions del tipus ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) amb kits de la casa comercial *Diaclone*. Aquestes van ser la *Human IL-6 High Sensitivity*, *Human TNF α* i *Human CD62L*. La tècnica d'ELISA s'utilitza en la biologia molecular per detectar un antigen (en aquest cas) o un anticòs a una determinada mostra basant-se en l'especificitat de la unió antigen-anticòs. Un dels dos components es troba adherit a un suport, de forma que queda immobilitzat, i generalment l'altre component dur conjugat un enzim que formarà un producte detectable quan se li afegeix el seu substrat. Hi ha diversos tipus d'ELISAs però en aquest estudi s'ha utilitzat el tipus sandvitx en fase sòlida (no competitiu) per la determinació qualitativa i quantitativa d'aquestes molècules *in vitro*.

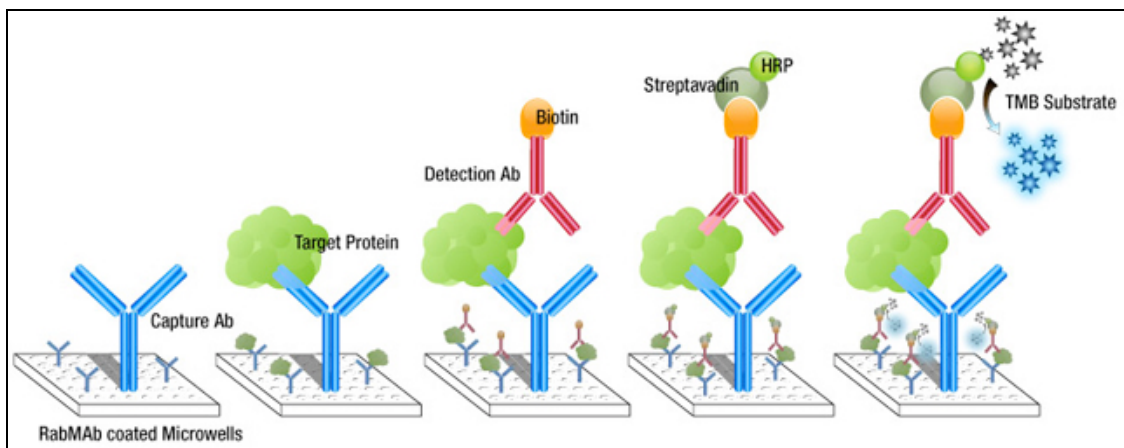


Figura 8. Fonament de la tècnica d'ELISA tipus sandvitx biotina-estreptavidina³⁴.

De forma breu, el procediment ha consistit en introduir un volum de $100\mu\text{L}$ de mostra o reactiu estàndard dins cada pouet de la placa d'ELISA que ja té els anticòs adherits per a cada molècula específica. Seguidament s'han afegit $50\mu\text{L}$ de l'anticòs biotinilitzat i s'han incubat a temperatura ambient durant 3 hores. Una vegada passat el temps, es fa un rentat i se li afegix $100\mu\text{L}$ d'estreptavidina que es troba conjugada amb l'enzim peroxidasa de rave picant (HRP) i es deixa a temperatura a ambient uns 30 minuts més. Posteriorment es torna a fer un altre rentat i se li afegix $100\mu\text{L}$ de TMB substrat i es deixa uns 15 minuts a temperatura ambient i en l'obscuritat.

Finalment se li afegeix la solució STOP (H_2SO_4) i es procedeix a fer la lectura a una longitud d'ona de 450nm.

Determinació de malondialdehid (MDA)

La concentració de MDA al plasma es va realitzar amb el kit colorimètric de la casa comercial *Calbiochem*. Breument indicar que es va iniciar a partir de 100 μ L mostra i 100 μ L d'aigua dins un eppendorf el qual se li afegí 650 μ L el reactiu de metilfenilindol i 150 μ L de HCl 12N. Acte seguit es deixa incubant a 45°C amb agitació durant 45 minuts. La següent passa és centrifugar-ho 2 minuts a 4500 rpm i ja es pot carregar la placa. Per acabar es realitza la lectura a una longitud d'ona de 586nm.

Anàlisi estadístic

L'eina estadística que es va utilitza per comparar els quatre grups d'estudi va ser una ANOVA de dos factors, usant el grau d'activitat física i sexes com a factors a considerar per veure si hi havia diferències significatives entre ells en les determinacions que es van fer. En els casos que hi havia diferències significatives es va usar una ANOVA d'un factor amb una prova *posthoc* (Bonferroni), per determinar entre quins grups hi havia diferències. Els valors $p < 0.05$ són considerats estadísticament significatius. Els valors s'expressen com la mitjana \pm error. Aquesta anàlisi va ser realitzada amb el programa SPSS versió 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. Resultats

Referent a les dades antropomètriques, en el cas de les dones no hi ha diferències significatives entre els grups actius i inactius excepte pel grau d'activitat física (1667 \pm 133 METS en inactives vs. 8143 \pm 334 METS en actives). Els homes actius presentaven menor pes, IMC, % grassa corporal i menor rati cintura/alçada i, realitzaven més activitat física (1561 \pm 116 METS en inactius vs. 9764 \pm 287 METS in actius) (Taula 1).

En primer lloc, una vegada analitzat el resultat de IL-6 s'observa que hi ha diferències significatives degut a la pràctica d'activitat física, observant diferències entre home inactiu i home actiu; i també entre dona inactiva i dona activa ($p < 0,05$). En els dos

casos, els grups inactius presenten nivells més elevats que els actius. S'observa que tant en el cas dels homes com de les dones, el fet de practicar activitat física regular provoca que tinguin nivells significativament inferiors que els grups sedentaris. En canvi no es troben diferències entre els dos gèneres.

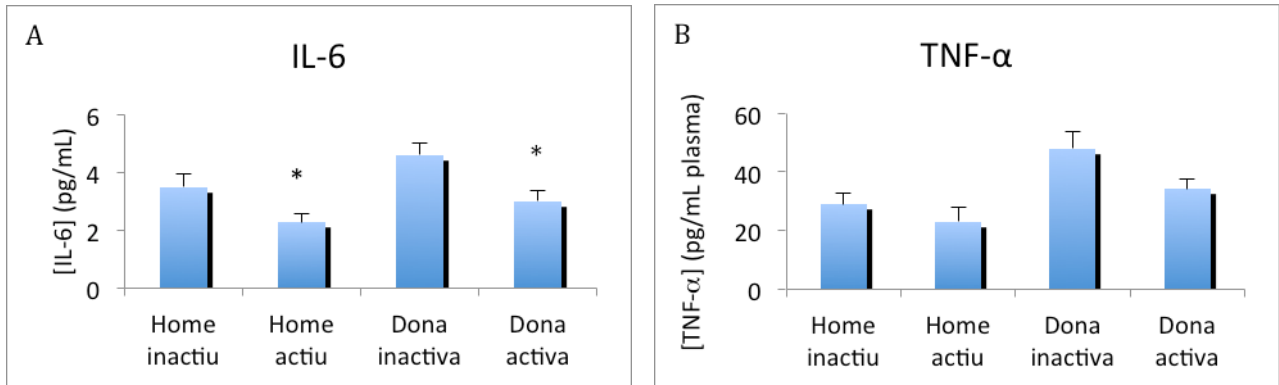


Figura 9. A) Estudi de la concentració de IL-6 circulant a homes i dones, actius i inactius. B) Determinació de la concentració de TNF- α circulant als diferents grups d'estudi. * Diferències significatives entre inactius i actius ($p < 0,05$).

En segon lloc, després d'haver analitzat els nivells plasmàtics de TNF- α no s'aprecien diferències significatives entre cap grup. Ara bé, es pot veure una tendència a que les dones tindrien uns nivells de partida lleugerament superiors als dels homes i que les dones inactives encara estarien un poc més per sobre d'aquest nivell (Figura 9, gràfica B).

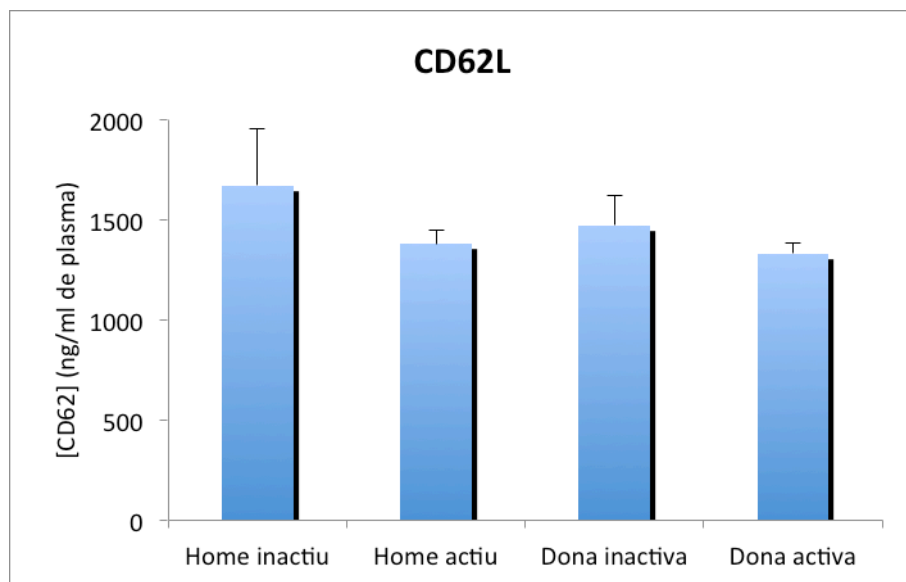


Figura 10. Anàlisi de la concentració de CD62L circulant en els quatre grups d'estudi.

En el cas dels nivells de CD62L analitzats, no s'han trobat diferències significatives entre cap grup però es veu una tendència dels grups inactius que tindrien nivells més elevats (Figura 10).

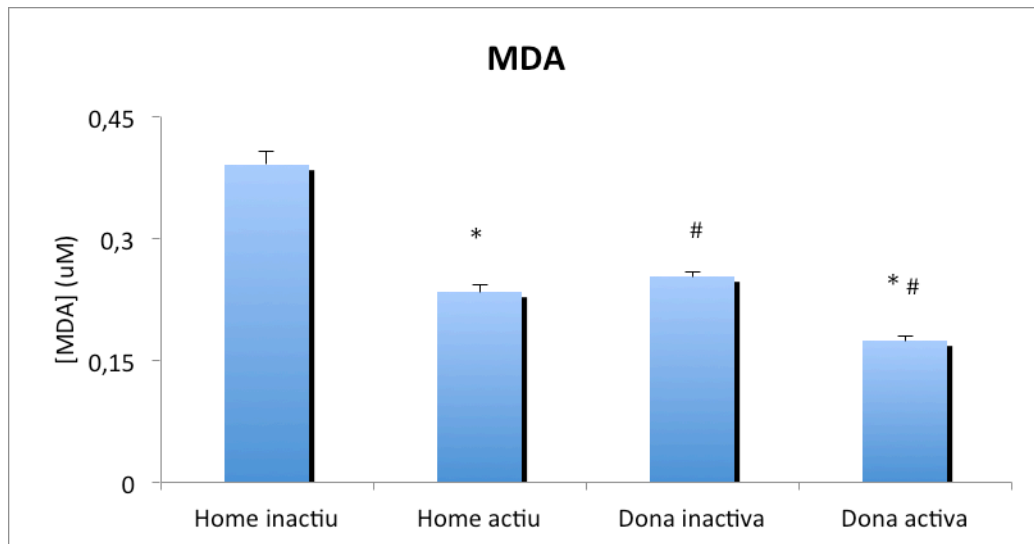


Figura 11. Determinació dels nivells plasmàtics de MDA en els diferents grups d'estudi. * Diferències significatives entre inactius i actius ($p < 0,05$). # Diferències significatives entre gèneres ($p < 0,05$).

Finalment, després d'haver analitzat els nivells de MDA s'observa que hi ha diferències significatives entre tots els grups d'estudi ($p < 0,05$) (Figura 11), tant entre gèneres com en grups actius i inactius. En el cas dels homes, es veu que la pràctica d'activitat física regular disminueix significativament els nivells de MDA; el mateix que passa en el cas de les dones ($p < 0,05$). A més, entre els homes i les dones, tant els grups actius com no actius, hi ha diferències significatives on les dones presenten nivells inferiors en els dos casos ($p < 0,05$).

5. Discussió

Els resultats presentats en aquest treball demostren que la pràctica regular d'activitat física indueix un menor grau d'inflamació com evidencien els menors nivells de IL-6 i un menor grau de dany oxidatiu amb una menor concentració de MDA al plasma.

El procés d'envelliment altera els marcadors circulants d'inflamació; amb l'edat s'instaura un cert grau de inflamació crònica caracteritzada per un increment de

mediadors pro-inflamatoris en la circulació sanguínia^{35,36}. L'exercici físic indueix una resposta antiinflamatòria, probablement regulada per la secreció de miocines com la IL-6⁸, que podria evidenciar-se en què els esportistes d'edat avançada que han continuat practicant esport al llarg de la seva vida, mantinguin una alta capacitat de secreció de miocines en front a un exercici físic i que en condicions basals estigui absent la inflamació crònica de baixa intensitat. Una de les citocines implicades és la IL-6, que a més de presentar efectes antiinflamatoris, potencia l'oxidació d'àcids grassos i una millor captació de glucosa estimulada per insulina⁸. En el present estudi la IL-6 es veu clarament afectada per la pràctica regular d'activitat física, on els individus actius presenten nivells inferiors que els inactius. Aquesta és una prova a favor de que la pràctica d'activitat física regular disminueix el grau de inflamació. Com han demostrat certs estudis, una sessió d'activitat física aguda provoca un augment de IL-6⁹ però també s'ha vist que si se segueix un entrenament regular, aquest increment s'atenua afavorint els biomarcadors antiinflamatoris¹¹. Ara bé, no s'han trobat diferències significatives entre gèneres però els homes podrien presentar nivells més elevats de marcadors inflamatoris per motius fisiològics i anatòmics, ja que tenen una complexió major que les dones³⁷. En canvi, en els resultats obtinguts sembla haver-hi una tendència en que les dones presentarien nivells superiors però tal vegada el motiu sigui perquè el grup estudiat no és massa elevat, amb una n=20 per cada grup. Es proposaria repetir les determinacions augmentant el nombre d'individus per veure si aquests nivells s'igualarien o realment la diferència es veuria magnificada fins a nivells estadísticament significants.

Augments del TNF- α de forma crònica s'associen directament a un estat de inflamació sistèmica de baix grau que participa en la instauració del síndrome metabòlic al interferir en la senyalització de la insulina i en definitiva, dificultant la captació i metabolització de la glucosa³⁸. Malgrat l'activitat física indueix un augment en l'expressió de TNF- α a nivell muscular, no hi ha evidències clares que suportin que comporti un augment significatiu dels nivells plasmàtics circulants³⁸. El TNF- α , també és secretat pels monòcits i macròfags, encara que tampoc hi ha cap resposta clara induïda per l'activitat física. Entre els diferents efectes beneficiosos de la pràctica regular d'activitat física es troba la inhibició de la producció de TNF- α millorant en

conseqüència el perfil inflamatori. Al present treball no trobem diferències significatives pel que fa el TNF- α entre els grups però sí que s'aprecia una tendència de que els individus actius tindrien nivells inferiors als inactius. Sembla que també es repeteixi el cas de que les dones tindrien valors més elevats que els homes però es podria aplicar el mateix raonament del nombre de participants dels grups d'estudi. Altres estudis suggereixen que l'exercici regular promou que el múscul alliberi IL-6 i una funció biològica d'aquesta seria la inhibició de la producció de TNF- α ³⁹.

Les molècules d'adhesió són glicoproteïnes expressades en la superfície d'una gran varietat de cèl·lules (cèl·lules endotelials, leucòcits i plaquetes) i participen en la resposta dels leucòcits a la inflamació. Algunes de les molècules d'adhesió cel·lular s'alliberen al plasma com formes solubles, donant informació sobre el grau d'activació endotelial o disfunció³. Un augment dels seus nivells circulants es relaciona amb processos inflamatoris i s'ha correlacionat de forma positiva amb el risc CV³. En la determinació de CD62L tampoc s'observen diferències significatives però sembla haver-hi una tendència dels grups inactius que presentarien nivells superiors que els actius. En principi, seria lògic pensar que sigui així perquè els grups inactius en general presenten un grau d'inflamació basal ja més elevada. La CD62L participa en el procés de migració de leucòcits quan hi ha un dany local, ja sigui una infecció o una inflamació i per tant un menor nivells es relacionaria amb un menor grau d'inflamació al grup més actiu.

La realització d'una activitat física augmenta el consum de O₂ i les demandes energètiques, augmentant la producció de ROS, que si no és contrarestada pels diferents antioxidants pot conduir a una situació d'estrès oxidatiu generant una situació que pot arribar a ser patològica⁴⁰. Malgrat això, l'augment puntual d'espècies reactives que es produeix després de l'activitat física aguda, sobretot si l'activitat es va realitzant de forma regular i moderada al llarg del temps, són essencials per activar la resposta adaptativa de l'organisme i reduir la incidència de dany oxidatiu⁴¹. De fet, la presència continuada i prolongada d'estimulants fisiològics oxidants durant l'entrenament provoca una adaptació en front a l'estrès oxidatiu, donant com a resultat una major protecció antioxidant^{42,43}. La mesura de MDA ens dóna una visió del grau general d'estrès oxidatiu a nivell sistèmic, ja que la determinació s'ha fet en

plasma. Els àcids grassos, sobretot els poliinsaturats, presents a les membranes són especialment susceptibles de ser atacats per les espècies reactives, a través de reaccions de peroxidació lipídica. Com a resultat es formen hidroperòxids els quals tenen una vida mitja relativament curta i es descomponen fins formar aldehids de cadena curta com 4-hidroxinonenal (4-HNE) i MDA⁴⁴. Un estil de vida sedentari promou que els teixits es deteriorin perquè les cèl·lules inactives acumulen danys i lesions cel·lulars i a més, presenten una menor capacitat antioxidant, cosa que pot provocar que els individus inactius (d'ambdós gèneres) presenten nivells més elevats de MDA. A més, hi ha diferències significatives entre homes i dones, on les dones presenten nivells inferiors. Als darrers anys s'ha posat de manifest que la capacitat antioxidant és dependent del gènere⁴⁵. Un dels casos que es proposen perquè les dones presentin un nivell inferior que els homes és que tenen una certa protecció a causa del sistema hormonal, sobretot en el cas dels estrògens⁴⁶. A més, els homes tenen una massa muscular major i per tant tenen una major capacitat de generar espècies reactives. Per altra banda, les persones actives, tenen un millor sistema antioxidant perquè les sessions d'exercici físic a la llarga estimulen aquest sistema de defensa endogen. Ara bé, aquest sistema és un equilibri molt fi entre ROS i els mecanismes antioxidants, per això s'ha d'assegurar que la balança estigui inclinada cap a la protecció antioxidant per així mantenir l'aspecte beneficiós. Actualment, a l'hora de valorar els efectes de l'activitat física s'han de tenir en compte tant els aspectes positius com negatius de la generació de ROS en l'activitat física³¹. S'ha vist que després d'una sessió aguda d'exercici es produeix dany oxidatiu en els neutròfils i això induïx les defenses antioxidants⁴⁷. Ara bé, a la llarga, si se segueix un entrenament regular s'ha vist que incrementa el sistema de protecció enfront al dany oxidatiu⁴⁸.

6. Conclusions

Els resultats obtinguts suggereixen que la pràctica d'activitat física regular condueix a una millora dels biomarcadors inflamatoris i de dany oxidatiu. A més, s'han trobat diferències significatives entre els dos gèneres pel que fa als nivells de MDA. El procés inflamatori es presenta de diferent forma en funció de si es tracta d'una lesió o d'una resposta a un exercici físic. L'activitat física influeix positivament sobre la salut dels individus interferint en malalties inflamatòries cròniques com la DMT2 o l'arteriosclerosi. Malgrat el fet de realitzar activitat física pugui produir en conjunt major quantitat d'espècies reactives de forma aguda, a la llarga s'ha vist que l'exposició a aquests nivells baixos i repetits de ROS potencien a les defenses antioxidants conferint una major protecció. El mateix mecanisme es podria aplicar en el cas dels marcadors inflamatoris, on el pic de IL-6 durant l'exercici és necessari perquè s'alliberin les altres citocines antiinflamatòries i així a la llarga potenciar un ambient antiinflamatori. Tot plegat, la finalitat és aconseguir un envelliment saludable a fi de garantir una qualitat de vida, disminuint el risc de patir malalties relacionades amb les complicacions de l'envelliment. Per això és molt important fer exercici físic des de ben petits, perquè ajuda a disminuir el risc CV, entre altres, ja que és la principal causa de mort dels països desenvolupats⁴⁹. Així i tot, faltaria definir concretament les condicions que determinen una correcta pràctica d'activitat física amb efectes beneficiosos per la salut.

7. Referències

1. Defensa innata frente a patógenos infecciosos « Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas. at <<http://epidemiologiamolecular.com/defensa-innata-patogenos-infecciosos/>>
2. Bühner, C., Berlin, C., Thiele, H. G. & Hamann, A. Lymphocyte activation and expression of the human leucocyte-endothelial cell adhesion molecule 1 (Leu-8/TQ1 antigen). *Immunology* **71**, 442–8 (1990).
3. Petridou, A. *et al.* Resistance exercise does not affect the serum concentrations of cell adhesion molecules. *Br. J. Sports Med.* **41**, 76–9; discussion 79 (2007).
4. Ivetic, A. Signals regulating L-selectin-dependent leucocyte adhesion and transmigration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 550–555 (2013).
5. Zarbock, A., Ley, K., McEver, R. P. & Hidalgo, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* **118**, 6743–51 (2011).
6. Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **557**, 1–583 (1989).
7. Ray, A. *et al.* Regulation of expression of interleukin-6. Molecular and clinical studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **557**, 353–61; discussion 361–2 (1989).
8. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* **88**, 1379–406 (2008).
9. Petersen, A. M. W. & Pedersen, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* **98**, 1154–1162 (2005).
10. Hirano, T., Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol. Today* **11**, 443–9 (1990).
11. Peterson, a M. W. & Pedersen, B. K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J Physiol Pharmacol* **57**, 43–51 (2006).
12. Beutler, B. & Cerami, A. Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr. Rev.* **9**, 57–66 (1988).
13. OMS | Preguntas más frecuentes. at <<http://www.who.int/suggestions/faq/es/>>
14. Walsh, N. P. *et al.* Maintaining immune health. *Most* 64–103 (2011).

15. Falch, J. a. The effect of physical activity on the skeleton. *Scand. J. Soc. Med. Suppl.* **29**, 55–58 (1982).
16. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–7 (2006).
17. Walsh, N. P. *et al.* Part one : Immune function and exercise. 6–63 (2011).
18. Beavers, K. M., Brinkley, T. E. & Nicklas, B. J. Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clin. Chim. Acta.* **411**, 785–93 (2010).
19. Oms. Estrategia Mundial Sobre Regimen Alimentario Actividad Fisica Y Salud. (2008).
20. Febbraio, M. A. & Pedersen, B. K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* **16**, 1335–47 (2002).
21. Pedersen, B. K. & Hoffman-Goetz, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol. Rev.* **80**, 1055–81 (2000).
22. Pedersen, B. K., Steensberg, A. & Schjerling, P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J. Physiol.* **536**, 329–37 (2001).
23. Suzuki, K. *et al.* Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc. Immunol. Rev.* **8**, 6–48 (2002).
24. Steensberg, A., Fischer, C. P., Keller, C., Møller, K. & Pedersen, B. K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E433–7 (2003).
25. Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P. & Pedersen, B. K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J. Physiol.* **515** (Pt 1), 287–91 (1999).
26. Ostrowski, K., Schjerling, P. & Pedersen, B. K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **83**, 512–5 (2000).
27. Keller, C. *et al.* Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J.* **15**, 2748–50 (2001).
28. Pedersen, B. K. The disease of physical inactivity--and the role of myokines in muscle--fat cross talk. *J. Physiol.* **587**, 5559–68 (2009).
29. Bastard, J.-P. *et al.* Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2084–9 (2002).

30. Nielsen, A. R. *et al.* Association between interleukin-15 and obesity: interleukin-15 as a potential regulator of fat mass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4486–93 (2008).
31. Yavari, A., Javadi, M., Mirmiran, P. & Bahadoran, Z. Exercise-Induced Oxidative Stress and Dietary Antioxidative. *Asian J. Sports Med.* **6**, 1–7 (2015).
32. Elosua, R., Marrugat, J., Molina, L., Pons, S. & Pujol, E. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *Am. J. Epidemiol.* **139**, 1197–209 (1994).
33. Elosua, R. *et al.* Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**, 1431–7 (2000).
34. ZAP-70 Total ELISA Kit, 6114-1. at http://www.epitomics.com/products/product_info/1257
35. Franceschi, C. *et al.* Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev.* **128**, 92–105 (2007).
36. Toth, M. J., Matthews, D. E., Tracy, R. P. & Previs, M. J. Age-related differences in skeletal muscle protein synthesis: relation to markers of immune activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E883–91 (2005).
37. Hansen, M. & Kjaer, M. Influence of sex and estrogen on musculotendinous protein turnover at rest and after exercise. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **42**, 183–92 (2014).
38. Peake, J. M., Della Gatta, P., Suzuki, K. & Nieman, D. C. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc. Immunol. Rev.* **21**, 8–25 (2015).
39. Starkie, R., Ostrowski, S. R., Jauffred, S., Febbraio, M. & Pedersen, B. K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J.* **17**, 884–886 (2003).
40. Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H. & Atalay, M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1208–46 (2013).
41. Tian, Y. *et al.* Serum oxidant and antioxidant status during early and late recovery periods following an all-out 21-km run in trained adolescent runners. *Eur. J. Appl. Physiol.* **110**, 971–6 (2010).
42. Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W. & Goto, S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.* **7**, 34–42 (2008).

43. Ferrer, M. D., Sureda, A., Mestre, A., Tur, J. A. & Pons, A. The double edge of reactive oxygen species as damaging and signaling molecules in HL60 cell culture. *Cell. Physiol. Biochem.* **25**, 241–52 (2010).
44. Free Radicals in Biology and Medicine: Barry Halliwell - Oxford University Press. at <<http://ukcatalogue.oup.com/product/9780198568698.do>>
45. Tiidus, P. M., Behrens, W. A., Madere, R. & Houston, M. E. Muscle vitamin E levels following acute submaximal exercise in female rats. *Acta Physiol. Scand.* **147**, 249–50 (1993).
46. Shen, T. *et al.* Tbx20 functions as an important regulator of estrogen-mediated cardiomyocyte protection during oxidative stress. *Int. J. Cardiol.* **168**, 3704–14 (2013).
47. Ferrer, M. D., Tauler, P., Sureda, A., Tur, J. A. & Pons, A. Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *J. Sports Sci.* **27**, 49–58 (2009).
48. Ferrer, M. D. *et al.* A soccer match's ability to enhance lymphocyte capability to produce ROS and induce oxidative damage. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **19**, 243–58 (2009).
49. Cordova, A., Villa, G., Sureda, A., Rodriguez-Marroyo, J. A. & Sánchez-Collado, M. P. Physical activity and cardiovascular risk factors in Spanish children aged 11-13 years. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.)* **65**, 620–6 (2012).
50. Chuaire-Noack, L., Sánchez-Corredor, M. C. & Ramírez-Clavijo, S. R. The Dual Role of Senescence in Tumorigenesis. *Int. J. Morphol.* **28**, 37–50 (2010).