



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Resposta de marcadors d'inflamació associada a l'exercici físic regular i agut.

Sergio Navarro Velázquez

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2015-16

DNI de l'alumne: 43207934L

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:

Citoquinas, expresión génica, malondialdehído, futbolistas, interleucinas, células sanguíneas mononucleares.

Índice

1. El proceso inflamatorio.....	4
1.1 Agentes causantes, fases y signos del proceso inflamatorio	4
1.2 Mediadores moleculares del proceso inflamatorio.....	5
1.3 Células implicadas y resolución de la respuesta inflamatoria.....	7
1.4 Diferencias entre inflamación e infección.....	8
2. El proceso inflamatorio en el ejercicio	9
2.1 Inflamación aguda inducida por el ejercicio	9
2.2 Crecimiento y reparación muscular tras la inflamación.....	10
2.3 El ejercicio como tratamiento para la inflamación.....	11
3. Objetivos.....	12
4. Materiales y métodos	13
4.1 Características antropométricas y condiciones físicas de los futbolistas ..	13
4.2 Toma de muestras y procesamiento	14
4.3 ELISA (Enzymed-Linked InmunoSorbent Assay).....	14
4.4 PCR cuantitativa (qPCR).....	16
4.5 Cuantificación de malondialdehído mediante colorimetría.....	17
5. Resultados.....	18
5.1 Niveles circulantes de IL-6, IL-10 e IL-1ra.....	18
5.2 Niveles relativos de expresión génica: NF- κ B, COX2, IL-1 β y MnSOD .	19
5.3 Niveles circulantes de MDA	20
6. Discusión.....	21
6.1 Niveles circulantes de IL-6, IL-10 e IL-1ra.....	21
6.2 Niveles relativos de expresión génica: NF- κ B, COX2, IL-1 β y MnSOD .	23
6.3 Niveles circulantes de MDA	24
7. Conclusión	25

Resumen

Es bien sabido en todo el ámbito deportivo y científico que el ejercicio agudo y de elevada intensidad genera inflamación en los músculos que ejerce contracciones tanto concéntricas como excéntricas. Pero recientes estudios están intentando demostrar como el ejercicio moderado y realizado de forma regular, disminuye este perfil pro-inflamatorio, facilitando la aparición de un ambiente anti-inflamatorio que mejore la reparación tisular.

Para este estudio se utilizaron muestras sanguíneas de futbolistas en 3 situaciones: al principio de la pre-temporada; tras 8 semanas de entrenamiento regular, antes de comenzar el entrenamiento; y tras 8 semanas de entrenamiento regular, después de realizar el entrenamiento. En esas muestras se determinaron los niveles circulantes de las interleucinas IL-6, IL-10 e IL-1ra y del malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica, así como los niveles de expresión génica de los genes que codifican para NF- κ B, COX2, IL-1 β y MnSOD en células mononucleares.

Los niveles plasmáticos de IL-6 e IL-1ra, aumentaron de forma significativa tras el ejercicio agudo (tras 8 semanas de entrenamiento regular, después de realizar el entrenamiento), respecto a las otras dos situaciones, pero no los de IL-10. Esto fue favorecido por la expresión génica significativamente alta de NF- κ B y MnSOD en la misma situación, pero solo respecto a la situación inicial (antes de la pre-temporada). Todo esto sumado a un aumento, pero no significativo, de MDA.

Por lo tanto, se puede deducir que el ejercicio prolongado, promueve el aumento de citoquinas anti-inflamatorias así como la expresión génica de genes que codifican para enzimas que tienen ese mismo papel. Aunque sea inevitable que el perfil proinflamatorio siempre aumente un poco.

Abstract

It is well known, throughout the sports and scientific fields, that acute and non-continuous exercise generates inflammation in muscles, induced by both concentric and eccentric contractions. However, recent studies are trying to demonstrate how the moderate exercise regularly performed decreases the proinflammatory profile, facilitating the appearance of an anti-inflammatory environment that enhances tissue repair.

In this study, blood samples from football players were extracted in 3 situations: at the beginning of the pre-season; after 8 weeks of regular training before beginning training; and after 8 weeks of regular training after completing training. In these samples, the circulating levels of interleukins IL-6, IL-10 and IL-1ra, and malondialdehyde (MDA) as a marker of lipid peroxidation, as well as gene expression levels of genes encoding NF- κ B, COX2, IL-1 β and MnSOD in mononuclear cells were determined.

The plasmatic levels of IL-6 and IL-1ra significantly increased after acute exercise (following 8 weeks of regular training after completing training), compared to the other two situations, but not IL-10. This was favoured by the significantly higher gene expression of NF- κ B and MnSOD in the same situation, but only compared to the initial situation. All this was combined with a non-significant increase of MDA.

Therefore, it can be deduced that prolonged exercise promotes an increase in the anti-inflammatory cytokines as well as in the expression of genes, which encodes enzymes having the same role. Nevertheless, a slight increase in pro-inflammatory mediators is inevitable.

1. El proceso inflamatorio



Figura 1. El proceso inflamatorio afecta a numerosas partes de nuestro organismo, entre ellas las articulaciones durante el ejercicio.

La inflamación es parte de una respuesta biológica compleja por parte de los tejidos corporales a un estímulo dañino, como patógenos, células dañadas o irritantes¹.

La inflamación es una respuesta protectora que implica la participación de células inmunitarias, vasos sanguíneos, y mediadores moleculares. El propósito de la inflamación es eliminar la causa inicial de la lesión celular, células con necrosis y tejidos dañados, así como la reparación de los tejidos afectados.

Los signos clásicos de la inflamación aguda son dolor, calor, enrojecimiento, hinchazón y pérdida de función. La inflamación es una respuesta genérica, y por lo tanto se considera como un mecanismo de la inmunidad innata, en comparación con la inmunidad adaptativa, que es específica para cada patógeno².

Una pequeña, pero continuada inflamación, puede conducir a la destrucción progresiva del tejido por el estímulo nocivo (por ejemplo, bacterias) y comprometer la supervivencia del organismo. En cambio, la inflamación crónica se relaciona con toda una serie de enfermedades, como la fiebre del heno, la periodontitis, la aterosclerosis, la artritis reumatoide, e incluso se relaciona con el cáncer. La inflamación es un proceso complejo finamente regulada por el cuerpo u organismo.

La inflamación puede ser clasificada como aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del cuerpo a los estímulos nocivos y se logra mediante el aumento de la circulación de plasma y leucocitos (especialmente granulocitos) de la sangre a los tejidos lesionados. Una serie de eventos bioquímicos propagan y maduran la respuesta inflamatoria, que implica el sistema vascular local, el sistema inmunológico, y varias células presentes en el tejido lesionado. La inflamación prolongada, conocida como inflamación crónica, conduce a un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el sitio de la inflamación, tales como células mononucleares, y se caracteriza por la destrucción y la curación del tejido afectado de forma simultánea.

1.1 Agentes causantes, fases y signos del proceso inflamatorio

Los principales agentes que causan inflamación son de muchos tipos, por lo que se ha realizado una clasificación sistemática para así poder comprender mejor como sucede todo este proceso inflamatorio. Así tenemos:

- Agentes biológicos: como por ejemplo bacterias, virus, hongos o parásitos
- Agentes que producen necrosis en los tejidos adyacentes, liberando mediadores moleculares que activan todo el proceso, entre ellos tenemos:
 - Agentes físicos: radiaciones, calor, rayos UV...
 - Agentes químicos: toxinas y venenos.
 - Cuerpos extraños y traumatismos, ya sea porque el propio traumatismo o cuerpo extraño desencadena la respuesta inmune o porque estos faciliten la entrada de microorganismos.

- Alteraciones en el flujo sanguíneo: por ejemplo una isquemia.
- Alteraciones del sistema inmune: por ejemplo procesos de autoinmunidad o de hipersensibilidad.

Ya sea dentro del tejido o en la migración celular, todo el proceso global de inflamación comprende los siguientes 5 eventos, los cuales son los denominados “los 5 puntos cardinales de la inflamación”:

- Tumefacción: es decir un aumento de la aportación de líquido intersticial con la consiguiente formación de un edema.
- Enrojecimiento o rubor en la zona: producido normalmente por la vasodilatación de la zona.
- Calor: producido por la vasodilatación y por el aumento del consumo de oxígeno.
- Dolor: por la presencia de prostaglandinas que activan los nociceptores.
- Disminución o pérdida de la función: también conocido como el 5º signo de Virchow, ya que los otros 4 fueron ya constatados por Celso en la antigua Grecia.

Las 3 fases básicas que producen estos efectos macroscópicos son las siguientes:

- 1) Aumento del transporte sanguíneo por vasodilatación.
- 2) Aumento de la permeabilidad de los capilares por retracción de las células endoteliales, dejando pasar grandes moléculas, como el complemento, citoquinas y plasma, así como los leucocitos que participan en la respuesta inflamatoria, esto se consigue gracias a unas fibras musculares lisas distribuidas longitudinalmente.
- 3) Salida y quimiotaxis de leucocitos hacia el foco que está generando el inicio del proceso inflamatorio.

La inflamación está bajo el control de diferentes moléculas que hacen que los leucocitos liberen sustancias proinflamatorias. Entre estas sustancias están las citoquinas proinflamatorias, algunas de ellas son las siguientes: histamina, serotonina, interleucina (IL)-8, factor citosólico de los neutrófilos (NCF), factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-1, IL-6, interferón (IFN)- γ ...

Este trabajo se centrará sobretodo en el proceso de la inflamación aguda, por lo que de ahora en adelante todos los procesos, marcadores, situaciones, etc. sobre los que se constaten datos estarán centrados en el proceso inflamatorio agudo. Aunque cabe mencionar que los efectos anti-inflamatorios beneficiosos comentados en este trabajo son a largo plazo.

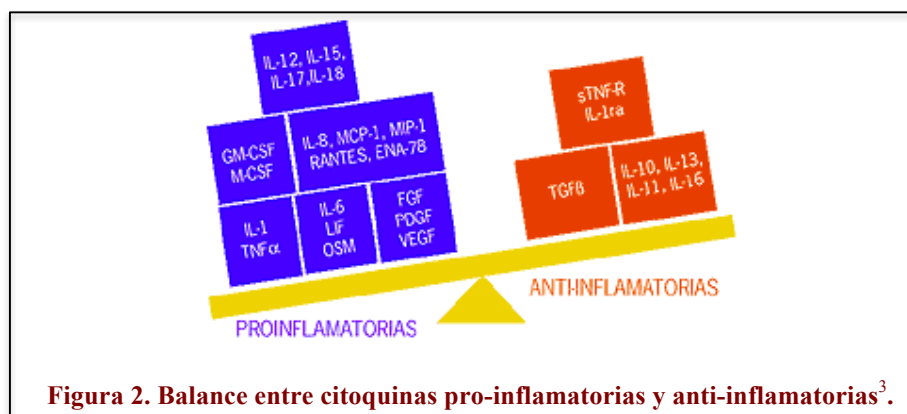
1.2 Mediadores moleculares del proceso inflamatorio

Los principales mediadores que se producen durante la inflamación se pueden dividir en diferentes grupos, entre ellos están:

- **Metabolitos del ácido araquidónico:** El ácido araquidónico (AA) proviene del ácido linoleico, este ácido se produce por acción de las fosfolipasas cuando son activadas por cualquier célula estresada o en estado de necrosis. Una vez liberado el AA puede ser metabolizado por dos vías:
 - La vía de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2): esta vía produce principalmente tres compuestos a partir del AA; las prostaglandinas, los tromboxanos y las prostaciclina.
 - La vía de las lipooxigenasas: esta vía genera leucotrienos y lipoxinas.

Los efectos principales de todos estos derivados del AA son: vasodilatación, fiebre, dolor, agregación plaquetaria, vasoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular...

- **Aminas vasoactivas:** Las principales aminas vasoactivas son la histamina y la serotonina, son sustancias preformadas en gránulos dentro de las células. La histamina suele estar producida normalmente por los mastocitos y su principal papel es la vasodilatación de arteriolas y el aumento de la permeabilidad en las vénulas. Mientras que la serotonina suele estar en plaquetas y algunas células neuroendocrinas, aunque su papel es prácticamente el mismo que el de la histamina.
- **Citoquinas:** son moléculas relativamente pequeñas (entre 5 y 20 kDa) que están consideradas prácticamente como hormonas, ya que su principal función es la señalización intercelular. Las citoquinas señalizan sobretodo las siguientes funciones celulares: proliferación (factores de crecimiento), diferenciación, migración (quimioquinas), apoptosis (familia TNF) y acción pro-inflamatoria (IL-1 y TNF- α). Son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales, adipocitos, del tejido muscular (miocitos) y del tejido conjuntivo. Las citoquinas se han clasificado clásicamente en función de su acción, ya sea pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, entre ellas destacan las siguientes:
 - Citoquinas proinflamatorias: IL-1, TNF- α , IL-6, factores de crecimiento (VEGF, FGF y PDGF), IL-8, IL-12...
 - Citoquinas anti-inflamatorias: Factor de crecimiento transformante (TGF)- β , IL-10, IL-1ra, IL-13, IL-11, IL-16...



- **Factor activador de las plaquetas (PAF):** se forma también a partir de los fosfolípidos como el AA y se encuentra en numerosas células del sistema inmunitario (plaquetas, PMN, monocitos...). Sus principales funciones son: agregación plaquetaria, vasoconstricción, broncoconstricción, adhesión de los leucocitos al endotelio, quimiotaxis, desgranulación, estallido oxidativo y activación de síntesis de eicosanoides.
- **Óxido nítrico:** es un gas producido principalmente por los macrófagos y las células endoteliales, produce vasodilatación mediante la inducción del GMPc.
- **Radicales libres del oxígeno (ROS):** Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón desapareado en un orbital externo. En este estado el radical es extremadamente reactivo e inestable y reacciona con todo tipo de componentes celulares: proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Inician reacciones autocatalíticas: también llamadas reacciones en cadena. Lo que hacen es robar un electrón a algún componente celular, como los antes mencionados. Su producción se basa en la activación del sistema NADPH oxidasa. Los principales ROS que se producen intracelularmente

son: el anión superóxido (O_2^{\sim}), el peróxido de hidrógeno H_2O_2 y el radical hidroxilo ($*OH$). El anión superóxido puede combinarse con el óxido nítrico para formar especies reactivas del nitrógeno. La acumulación de ROS es uno de los elementos que tiene más peso en la lesión mitocondrial ya que es un orgánulo en el cual se producen más radicales en toda la célula. De todas formas también es un agente lesivo celular importante en general. Existen numerosas defensas antioxidantes que previenen su formación o que los neutralizan después de su generación⁴. En función de su origen las defensas antioxidantes pueden ser endógenas o exógenas. Entre las endógenas se encuentran:

- Enzimas antioxidantes: Catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa.
- Proteínas quelantes de metales: Ceruloplasmina, ferritina, lactoferrina, hemoglobina, mioglobina, transferrina, metalotioneína.
- Moléculas antioxidantes: Bilirrubina, ácido úrico, glutatión (GSH) y otros tiores, etc.

Entre los antioxidantes exógenos se pueden destacar:

- Vitaminas A, C y E, carotenoides, flavonoides, y diversos metales como manganeso, selenio, cobre y zinc que actúan como cofactores de los enzimas antioxidantes.

En una situación en la cual la producción de ROS supera la capacidad antioxidante, esto produce una situación de estrés oxidativo, produciéndose un desequilibrio desfavorable para la célula. Una vez instaurada esta situación los ROS producen daños sobre los componentes celulares, entre ellos está:

- El cambio en la estructura de los lípidos conlleva cambios en la composición de las membranas. Por ejemplo uno de los principales componentes que se producen es el malondialdehído (MDA), un marcador de peroxidación lipídica que se mide con facilidad en el suero.
- La oxidación de las proteínas que normalmente va acompañado a un cambio en su función.
- La oxidación de las bases nitrogenadas y los glúcidos de las pentosas que constituyen los ácidos nucleicos. Se utiliza la formación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina como índice de daño oxidativo en el ADN y su excreción en orina supone un marcador para la estimación de la velocidad de reparación del ADN⁴.
- **Constituyentes de los lisosomas de los leucocitos:** elastasas, colagenasas, proteasas... que se activan normalmente en situaciones de apoptosis y necrosis liberados por los daños en las membranas lisosomales producidos por los ROS.
- **Neuropéptidos:** propagan la respuesta inflamatoria, destacan el neuropéptido A y el neuropéptido P.
- **Mediadores derivados de proteínas plasmáticas:** en la familia de las quininas destaca la bradiquinina; en la familia del complemento tenemos C3a y C5a; y en la vía de la coagulación la trombina.

1.3 Células implicadas y resolución de la respuesta inflamatoria

En la inflamación actúan numerosos tipos de células, aunque los dos tipos de leucocitos más importantes son los leucocitos PMN neutrófilos y los macrófagos.

El tejido conjuntivo contiene macrófagos y mastocitos, que son células capaces de detectar la presencia de células muertas o dañadas. Los macrófagos son los principales causantes del inicio del proceso de inflamación, ya que poseen receptores específicos para detectar células muertas. Cuando reconocen estas células, los macrófagos secretan las citoquinas: IL-1 y TNF- α , que promueven la inflamación, activando las células endoteliales de las venas cercanas (sobre todo las vénulas eferentes), para que se pueda producir la migración de los leucocitos a través de los endotelios. Los mastocitos se activan frente al estrés físico que se produce en los tejidos (calor, frío, presión) y secretan los mediadores serotonina e histamina, que son potentes sustancias vasoactivas.

El daño tisular está causado por los PMN, que son muy abundantes y liberan enzimas hidrolíticas y radicales libres que pueden producir daños en los tejidos adyacentes. La regeneración es producida por los macrófagos, que activan los fibroblastos para que sintetizen colágeno, y a las células endoteliales para que generen nuevos vasos, mediante la secreción de factores de crecimiento⁵.

Ya que el proceso inflamatorio puede llegar a generar daños importantes, es importante detenerlo en el momento justo y adecuado. En parte, la inflamación desaparece porque los mediadores tienen vidas medias cortas, y se degradan rápidamente tras su liberación. Los neutrófilos también tienen una vida media corta y mueren por apoptosis unas pocas horas después de dejar la sangre. Además, durante el desarrollo del proceso inflamatorio se disparan una serie de señales de STOP que sirven para terminar la reacción de forma activa⁵:

- Cambio en los metabolitos generados a partir del AA, se sustituyen los leucotrienos pro-inflamatorios por las lipoxinas anti-inflamatorias, algunas de estas lipoxinas son por ejemplo las resolvinas o las protectinas⁶.
- Los macrófagos y otras células secretan citoquinas antiinflamatorias, como TGF- β e IL-10.
- Generación de mediadores lipídicos antiinflamatorios.
- Generación descargas colinérgicas que detienen la producción de TNF por los macrófagos.

1.4 Diferencias entre inflamación e infección

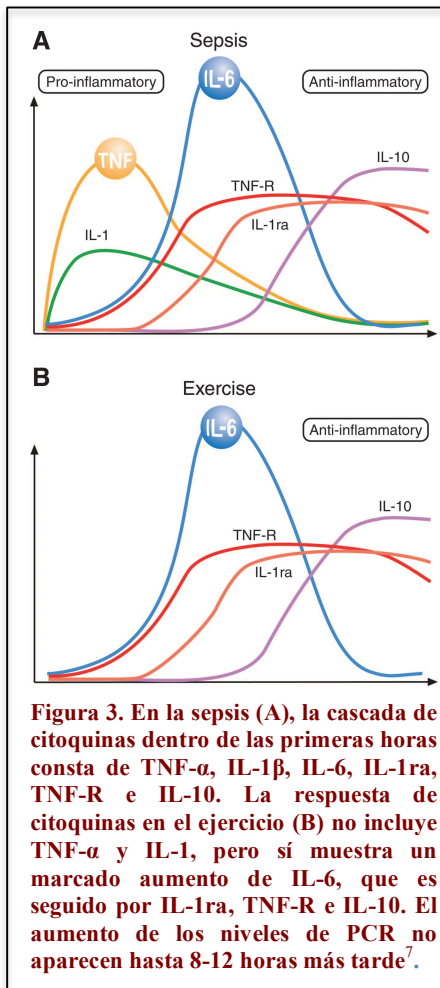
La inflamación es la respuesta inmunitaria del cuerpo a los estímulos nocivos, posiblemente en respuesta a una infección, pero no siempre es el caso, puede darse por una isquemia, al realizar un ejercicio físico intenso, etc. La inflamación es esencialmente parte del intento del cuerpo por auto-repararse y es una respuesta fisiológica. Incluso cuando una infección es la causa de la inflamación, la respuesta inflamatoria no es la propia infección, es decir la inflamación es simplemente la respuesta a esa situación.

Mientras que las infecciones, son invasiones del organismo causadas por virus, hongos o bacterias. Las infecciones se producen sin una lesión obvia en el área afectada y una de las consecuencias que producen son la inflamación. Por lo tanto podría decirse que la infección es una de las muchas causas que pueden llegar a desencadenar el proceso inflamatorio.

Además, a nivel bioquímico se ha observado que los patrones de secreción de citoquinas son diferentes cuando se produce una inflamación fisiológica (por ejemplo, tras la realización de ejercicio físico) respecto a cuándo se produce una respuesta inmune (por ejemplo, por una infección bacteriana o vírica).

Mayoritariamente, los estudios sobre las citoquinas surgen del estudio de la sepsis o infección. En la sepsis y sus modelos experimentales, la cascada de citoquinas consta de

(nombrado por orden) TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1ra, TNF-Rs e IL-10. Las dos primeras citoquinas en la cascada son TNF- α y la IL-1 β , que son producidos localmente. Estas citoquinas se definen generalmente como citoquinas proinflamatorias. El TNF- α y la IL-1 estimulan la producción de IL-6, que ha sido clasificada tanto como una citoquina pro- como anti-inflamatoria. La respuesta de citoquinas generada por el ejercicio difiere de la provocada por infecciones graves. El hecho de que las citoquinas proinflamatorias clásicas, como el TNF- α y la IL-1 β , en general no aumenten con el ejercicio, indica que la cascada de citoquinas inducida por el ejercicio difiere notablemente de la cascada de citoquinas inducida por las infecciones. Típicamente, la IL-6 es la primera citoquina presentes en la circulación durante el ejercicio. El nivel de IL-6 circulante aumenta de manera exponencial (hasta 100 veces) en respuesta al ejercicio y la disminuye en el período de post-ejercicio. Otro hallazgo en relación con el ejercicio, es que aumentan los niveles circulantes de citoquinas anti-inflamatorias bien conocidas e inhibidores de las citoquinas, tales como IL-1ra y TNF-Rs. En conjunto, el ejercicio provoca un aumento principalmente en la IL-6, seguido de un aumento de la IL-1ra y IL-10 (ver Fig. 3). La aparición de IL-6 en la circulación es de lejos el más marcado y su aspecto precede a la de las otras citoquinas⁷.



Por lo tanto los patrones de respuesta fisiológica serán totalmente distintos dependiendo de si estamos ante una situación de inflamación causada por un estímulo no infeccioso, por ejemplo el ejercicio agudo, o si estamos ante un estímulo infeccioso, por ejemplo la acción de un virus o una bacteria.

2. El proceso inflamatorio en el ejercicio

Recientes estudios han demostrado que el ejercicio agudo es capaz de inducir estrés oxidativo y de iniciar y propagar el proceso inflamatorio⁸. Mientras que otros han demostrado que la realización del ejercicio de forma regular y continuada induce adaptaciones asociadas al entrenamiento, entre ellas una disminución del proceso inflamatorio. Se ha descubierto que el músculo es un órgano secretor⁹ y cuando éste se ve dañado debido al ejercicio secreta citoquinas, que en su caso pasan a ser llamadas mioquinas, estas citoquinas son capaces de activar al sistema inmune y así iniciar el proceso inflamatorio. Sin embargo, en pacientes con determinadas patologías inflamatorias crónicas, se observó que la realización de ejercicio de baja intensidad de forma regular promovía la secreción de mioquinas anti-inflamatorias por parte del músculo, mejorando así la situación inflamatorio de los enfermos¹⁰.

2.1 Inflamación aguda inducida por el ejercicio

La inflamación aguda de las células musculares, como se entiende en la fisiología del ejercicio¹¹, puede ser inducida después del entrenamiento muscular excéntrico y concéntrico. La participación en la formación y acondicionamiento excéntrico, incluida la formación y las

actividades que hacen hincapié en la extensión excéntrica del músculo, por ejemplo correr cuesta abajo en una inclinación moderada-alta, puede resultar en un dolor considerable a las 24-48 horas; a pesar de que los niveles de lactato en sangre, se pensaba anteriormente que podían causar dolor muscular, eran mucho más altos cuando se ejecutaba el ejercicio. Este dolor muscular de aparición tardía (*delayed onset muscle soreness* (DOMS)) es producto del daño estructural de los filamentos contráctiles y de los discos-z, que se ha observado especialmente en los corredores de maratón, cuyas fibras musculares revelaron un notable deterioro de las mismas tras el entrenamiento y la maratón¹².

Los discos-Z son el punto de contacto para las proteínas contráctiles y proporcionan un soporte estructural para la transmisión del esfuerzo cuando las fibras musculares se activan para acortarse. Sin embargo, en los corredores de maratón y los que forman parte del principio de sobrecarga para mejorar sus músculos, muestran una transmisión moderada en los discos-Z y una rotura importante de filamentos gruesos y delgados en grupos paralelos de sarcómeros como resultado de la fuerza de acciones excéntricas o por el estiramiento de fibras musculares muy juntas y apretadas.

Esta rotura de las fibras musculares activa un aumento de los leucocitos tras el dolor muscular, lo que lleva a la observación del proceso inflamatorio. La elevación de las enzimas plasmáticas, de la mioglobinemia y una histología anormal de los músculos y su ultraestructura permitió llegar a la conclusión de que todo estaba asociado con la respuesta inflamatoria. Una alta tensión en el sistema contráctil-elástico de los músculos dio lugar al daño estructural de la fibra muscular su plasmalema, y su epimisio, perimisio, y/o endomisio. El daño muscular altera la homeostasis del calcio tanto en las fibras individuales como en los haces de fibras lesionados, lo que resulta en una necrosis que alcanza su máximo aproximadamente 48 horas después del ejercicio. Los productos de la actividad de los macrófagos y los contenidos intracelulares (tales como histaminas, quininas y K^+) se acumulan en el espacio extracelular⁸. Estas sustancias estimulan a continuación, las terminaciones nerviosas libres en el músculo; un proceso que parece estar acentuado por el ejercicio excéntrico, en el cual las fuerzas grandes se distribuyen sobre un área relativamente pequeña de la sección transversal del músculo¹³.

2.2 Crecimiento y reparación muscular tras la inflamación

Existe una relación conocida entre la inflamación y el crecimiento muscular¹⁴. Por ejemplo, las altas dosis de medicamentos anti-inflamatorios (por ejemplo, anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs)) son capaces de atenuar el crecimiento muscular^{14,15}. También se ha demostrado que la terapia con frío afecta negativamente al crecimiento muscular.

Se ha teorizado también que la respuesta inflamatoria aguda localizada en la contracción muscular durante el ejercicio, tal como se describe más arriba, es un precursor necesario para el crecimiento muscular¹⁶. Como respuesta a las contracciones musculares, la respuesta inflamatoria aguda inicia la descomposición y eliminación del tejido muscular dañado¹⁷. los músculos pueden sintetizar citoquinas en respuesta a las contracciones¹⁸⁻²⁰, de tal manera que las citoquinas, IL-1 β , TNF- α e IL-6, se expresan en el músculo esquelético hasta 5 días después de realizar ejercicio¹⁷.

En particular, el aumento de los niveles de IL-6, una mioquina, puede alcanzar concentraciones hasta cien veces los niveles en reposo²⁰. En función del volumen, la intensidad, y otros factores de entrenamiento, el aumento de IL-6 asociado con el entrenamiento se inicia aproximadamente 4 horas después del entrenamiento de resistencia y permanece elevada hasta 24 horas²¹⁻²³.

Estos aumentos agudos de citoquinas, como respuesta a las contracciones musculares, ayudan a iniciar el proceso de reparación y crecimiento muscular mediante la activación de las células satélite en el músculo inflamado. Las células satélite son cruciales para la adaptación del músculo esquelético al ejercicio²⁴. Estas contribuyen a la hipertrofia proporcionando nuevos mionúcleos y reparan segmentos dañados de las fibras maduras para conseguir así una correcta regeneración después de los daños musculares asociados con lesiones o inducidos por el ejercicio.

Tras las contracciones se produce una localización rápida y transitoria del receptor de IL-6 y el aumento de la expresión de IL-6 en las células satélite²¹. La IL-6 se ha demostrado que tiene un poder mediador en el crecimiento muscular hipertrófico tanto *in vitro* como *in vivo*²⁴. También se ha demostrado que realizar ejercicio de forma no rutinaria puede aumentar los niveles de IL-6 hasta seis veces los valores normales, a las 5 horas después del ejercicio, y el triple hasta 8 días después del ejercicio²⁵.

El desarrollo de la investigación ha demostrado que muchos de los beneficios del ejercicio están mediados a través de la función del músculo esquelético como un órgano endocrino. Es decir, los músculos que se contraen liberan múltiples sustancias conocidas como mioquinas (citoquinas), incluyendo, pero no siendo las únicas, a las citadas en la descripción anterior, que promueven el crecimiento de nuevos tejidos, la reparación de tejidos, y varias funciones anti-inflamatorias, que a su vez reducen el riesgo de desarrollar diversas enfermedades inflamatorias. El nuevo concepto de que el músculo es un órgano endocrino está transformando nuestra comprensión de la fisiología del ejercicio y, con ella, del papel de la inflamación en la adaptación al estrés⁹.

2.3 El ejercicio como tratamiento para la inflamación

Recientemente se ha demostrado que la actividad física regular es útil para disminuir los marcadores de inflamación^{26,27}, aunque la correlación es imperfecta y parece revelar diferentes resultados dependiendo de la intensidad del entrenamiento. Por ejemplo, aunque algunas mediciones basales de los marcadores inflamatorios circulantes no difieren en gran medida entre los adultos sanos entrenados y no entrenados²⁸, el ejercicio a largo plazo puede disminuir la inflamación crónica de grado bajo²⁹. Por otro lado, los niveles de la mioquina anti-inflamatoria IL-6 se mantuvieron elevados ya en el período de recuperación después de una serie aguda de ejercicio en pacientes con enfermedades inflamatorias, en relación con la recuperación de los controles sanos²⁹. Es muy posible que el entrenamiento de baja intensidad pueda reducir los marcadores pro-inflamatorios durante el descanso (PCR, IL-6), mientras que el entrenamiento de intensidad moderada tenga beneficios anti-inflamatorios leves y menos establecidos^{30,31}. Existe una fuerte relación entre el ejercicio exhaustivo y la inflamación crónica de grado bajo. Las carreras de maratón puede aumentar los niveles de IL-6 cien veces más de lo normal, así como el recuento total y la movilización leucocitos neutrófilos³².

Con respecto a lo anterior, la IL-6 previamente había sido clasificada como una citoquina proinflamatoria. Por lo tanto, se pensó primero que la respuesta de la IL-6 inducida por el ejercicio se relacionaba con el daño muscular²⁰. Sin embargo, se ha hecho evidente que el ejercicio excéntrico no se asocia con un mayor incremento de los niveles plasmáticos de IL-6 comparado con el ejercicio asociado a las contracciones musculares concéntricas "no dañinas". Este hallazgo demuestra claramente que el daño muscular no es necesario para provocar un aumento de los niveles plasmáticos de IL-6 durante el ejercicio. Pero es un hecho que el ejercicio excéntrico puede dar lugar a un pico retardado y una disminución mucho más lenta de los niveles plasmáticos de IL-6 durante la recuperación⁹.

Trabajos recientes han demostrado que tanto las vías de señalización ascendentes como las descendentes, de la IL-6, difieren notablemente entre los miocitos y los macrófagos. Parece que a diferencia de la señalización de la vía de la IL-6 en los macrófagos, que depende de la activación de la vía de señalización de NF- κ B; la expresión intramuscular de la IL-6 está regulada por una red de cascadas de señalización, incluyendo las vías del Ca²⁺/NFAT y de la MAPK glucógeno/p38. Por lo tanto, cuando se produce la señalización por la IL-6 en los monocitos o macrófagos, se crea una respuesta pro-inflamatoria, mientras que cuando se produce la activación de la IL-6 y la señalización en el músculo es totalmente independiente de una respuesta previa dependiente de TNF o de la activación de NF- κ B, y es anti-inflamatoria³³.

Varios estudios muestran que los marcadores de inflamación se reducen siguiendo cambios en el comportamiento a largo plazo que implican tanto la reducción de la ingesta de calórica y como un programa regular de aumento de la actividad física, y que, en particular, la IL-6 fue mal clasificado como un marcador proinflamatorio. Por ejemplo, los efectos anti-inflamatorios de la IL-6 se han demostrado por la estimulación de la IL-6, que actúa produciendo las citoquinas anti-inflamatorias clásicas: la IL-1ra y la IL-10³³.

El único papel biológico conocido de la IL-1ra es su capacidad de unirse al receptor de la IL-1 y de ese modo inhibir la función de IL-1 α y la IL-1 β . La IL-1ra es producida principalmente por monocitos y macrófagos después de la estimulación con lipopolisacáridos o las citoquinas IL-4, IL-6, IL-10 e IL-14. Por otro lado, la IL-10 es producida por los linfocitos Th2, los monocitos y las células B, e inhibe varias vías inmunológicas. Por otra parte, la IL-10 es un potente inhibidor de las citoquinas derivadas de los linfocitos Th1, de los monocitos y de los macrófagos. Además, la IL-10 atenúa la expresión en la superficie celular de los receptores de TNF- α ³⁴.

Por lo tanto, los investigadores que apoyan el ejercicio como un medio para tratar los factores causales subyacentes a la inflamación crónica, están llevando a cabo una “carrera” fuertemente apoyada por la investigación actual, que ha demostrado como un estilo de vida sedentario está fuertemente asociado con el desarrollo y la progresión de varias enfermedades inflamatorias. Aunque también hay que tener en cuenta que un exceso de ejercicio tampoco es beneficioso para el organismo.

3. Objetivos

El objetivo del presente estudio ha sido demostrar que el ejercicio agudo promueve la inflamación, pero que si este ejercicio se realiza de forma regular y continuada puede llegar a tener efectos anti-inflamatorios y beneficiosos para el organismo. Los objetivos más concretos de este estudio han sido:

- Demostrar que la realización de ejercicio agudo propicia la producción de especies reactivas y favorece la producción de citoquinas pro-inflamatorias.
- Probar que la práctica regular de ejercicio físico promueve un patrón de secreción de citoquinas anti-inflamatorias concreto, y además, favorece la aparición un perfil anti-inflamatorio.
- Constatar que el ejercicio regular promueve la expresión de genes que codifican para proteínas, como citoquinas y enzimas, que promueven una acción anti-inflamatoria y antioxidante.
- Evidenciar que el ejercicio agudo induce el aumento de marcadores de estrés oxidativo como el MDA.

4. Materiales y métodos

Para el estudio realizado se usaron diferentes muestras sanguíneas de futbolistas en diferentes condiciones físicas para poder cuantificar así marcadores de pro-inflamación y/o de anti-inflamación. Los principales marcadores cuantificados fueron:

- IL-6, IL-1 β e IL-1ra circulantes mediante el método de ELISA.
- NF- κ B, COX2, IL-1 β y MnSOD mediante el método de PCR-cuantitativa (qPCR) en células mononucleares (PBMC).
- MDA mediante colorimetría en plasma.

4.1 Características antropométricas y condiciones físicas de los futbolistas

El grupo de estudio consiste en 9 futbolistas (pertenecientes al Reial Mallorca B), todos ellos de sexo masculino. Se les realizó un estudio antropométrico previo al estudio para determinar características antropométricas como: edad, peso, altura, IMC y VO₂max (ver Tabla 1). Tras el estudio antropométrico se les extrajo diferentes muestras sanguíneas para comparar marcadores inflamatorios en 3 condiciones distintas:

- Al principio de la pre-temporada (“Basal inicio” de ahora en adelante): en estas condiciones intentamos medir los niveles basales de marcadores inflamatorios, después de no haber realizado ejercicio durante su temporada de descanso
- Tras 8 semanas de entrenamiento regular, realizando la preparación física propia de la pre-temporada y del inicio de la temporada competitiva, antes de comenzar el entrenamiento (“Basal 8 semanas” de ahora en adelante): en estas condiciones se intentar determinar los marcadores inflamatorios para poderlos comparar con la situación “Basal inicio” y así determinar si el ejercicio regular aumenta o disminuye los marcadores inflamatorios.
- Tras 8 semanas de entrenamiento regular, después de realizar el entrenamiento (“8 semanas post-ejercicio” de ahora en adelante): en estas condiciones se intentar determinar los marcadores inflamatorios para poderlos comparar con la situación “Basal 8 semanas” y así determinar si el ejercicio agudo aumenta o disminuye los marcadores inflamatorios.

Tabla 1. Características antropométricas de los futbolistas

Característica antropométrica	Valor
Edad (años)	19,5 \pm 0,4
Peso (Kg)	76,5 \pm 1,9
Altura (cm)	179 \pm 2
IMC (Kg/m²)	24,0 \pm 0,6
VO₂max (mL/Kg·min)	60,7 \pm 1,6

Todos los sujetos fueron informados del propósito y las exigencias del estudio antes de dar su consentimiento por escrito para participar. El protocolo de estudio fue de conformidad con la Declaración de Helsinki para la investigación en seres humanos y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares N° 994/08 IB PI (Palma de Mallorca, Islas Baleares, España).

4.2 Toma de muestras y procesamiento

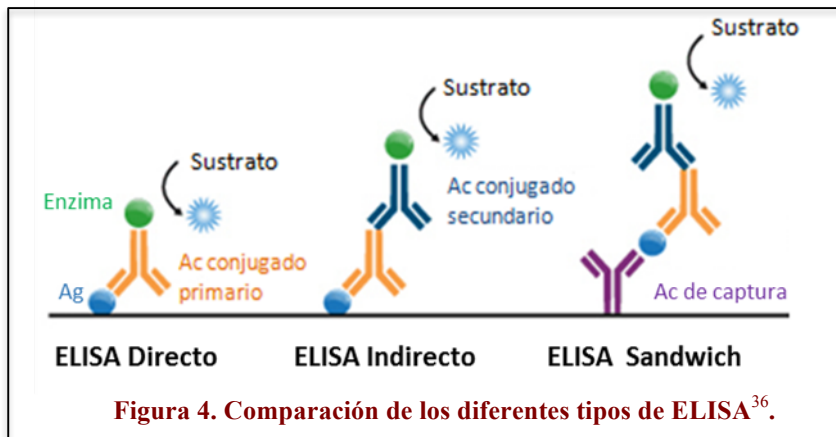
Las muestras de sangre venosa se tomaron de la vena antecubital con el sistema vacutainer en tubos que contienen EDTA como anticoagulante. Las muestras de sangre fueron extraídas en las 3 situaciones mencionadas anteriormente. Una alícuota de sangre se introdujo cuidadosamente en Ficoll en una proporción de 1,5:1 y luego se centrifugó a 900 xg, a 4 °C durante 30 minutos. se obtuvo una fase intermedia que contiene las PBMCs y que fue retirada cuidadosamente. Después, la suspensión PBMCs se lavó dos veces con PBS y se centrifugó durante 10 min a 1.000 xg, 4 °C. Este proceso se realizó por duplicado, una de las muestras estaba destinada a la obtención de ARN para realizar las determinaciones de la expresión génica. Los lisados celulares se almacenaron a -80 °C hasta los análisis bioquímicos.

Una segunda alícuota de sangre fue centrifugada a 900 xg, a 4 °C durante 20 minutos y posteriormente, el plasma fue recuperado. Estas muestras de plasma, fueron utilizadas para la determinación de los niveles de diferentes IL circulantes mediante el método de ELISA, y para determinar la cantidad de MDA.

4.3 ELISA (Enzymed-Linked InmunoSorbent Assay)

La técnica ELISA³⁵ (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) es un tipo de inmunoensayo en el cual un antígeno fijado es detectado por un anticuerpo, el cual lleva ligado una enzima que transforma un sustrato en un producto cuantificable, normalmente este producto cuantificable puede ser medido por colorimetría. Normalmente esta técnica se realiza en placas de 96 pocillos transparente para poder detectar posteriormente el producto cuantificable. Rutinariamente se utilizaba para detectar anticuerpos específicos en sangre contra un determinado antígeno, pero a día de hoy sirve tanto para cuantificar antígenos como anticuerpos. Existen diferentes tipos de ELISA:

- ELISA directo: en este tipo de ELISA se preparan las placas con las muestras en las que se sospecha que está presente el antígeno. Una vez preparados los controles positivos y negativos, se incubaba la muestra con un anticuerpo primario marcado con la enzima y tras esto se le agrega el sustrato. Las muestras en las que se observe producto cuantificable serán aquellas en las que había presente el antígeno (ver Fig. 4).
- ELISA indirecto: en este tipo de ELISA las placas son iguales que en el directo. La diferencia con el ELISA directo es que el anticuerpo primario no está marcado con la enzima, sino que tras la incubación con el anticuerpo primario, ese anticuerpo primario es detectado mediante un anticuerpo secundario que es el que va marcado con la enzima. Permitiendo así amplificar la señal del producto cuantificable (ver Fig. 4).
- ELISA sándwich: en este tipo de ELISA las placas han sido previamente recubiertas con un anticuerpo comercial que es capaz de detectar el antígeno de la muestra. Tiene la ventaja de que tras incubar la muestra en los pocillos estos se pueden lavar y así eliminar el exceso de muestra para cuantificar realmente el antígeno presente. Tras incubar el antígeno y que éste se haya unido al anticuerpo comercial fijado en la placa, el procedimiento es idéntico al de un ELISA directo o indirecto (ver Fig. 4). Muchos laboratorios han implementado la sensibilidad del método utilizando anticuerpos marcados con biotina-estreptavidina/avidina.

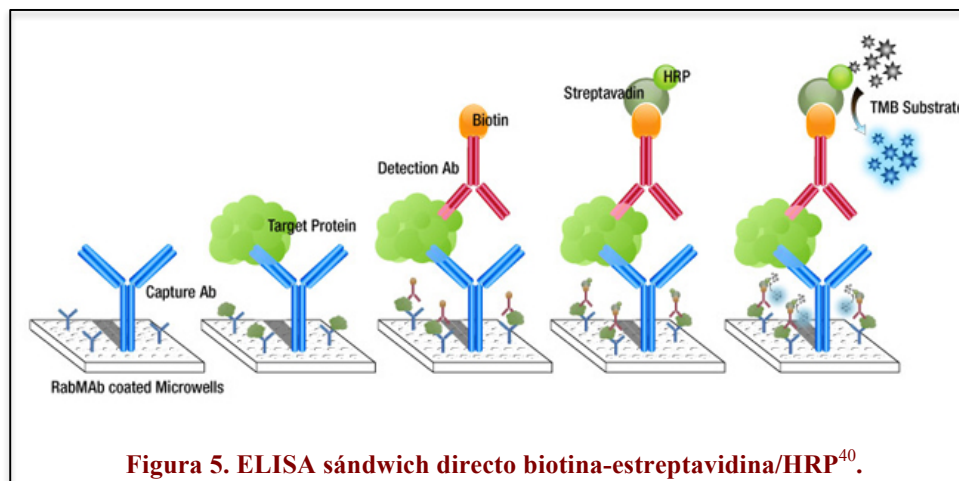


En este estudio fueron cuantificadas en plasma tres interleucinas mediante esta técnica: IL-6, IL-10 e IL-1ra. Para todas ellas se utilizaron kits comerciales que facilitan el estudio de las muestras.

Para la IL-6 se utilizó un kit de la casa comercial Diaclone® “Human IL-6 ELISA KIT” (Cat. No: 950.030.096). Este kit se basa en el principio de un ELISA sándwich directo, utilizando anticuerpos biotinilados a los cuales se les une posteriormente un complejo de estreptavidina-HRP que transformarán el sustrato de TMB en un producto de color azulado, tras esto se añade un ácido para detener la reacción que transformara el producto azulado en un producto amarillento cuantificable a una longitud de onda (λ) de 450 nm. Se siguió el protocolo establecido por la casa comercial³⁷ realizando una recta patrón y determinando así la concentración de IL-6 de las diferentes muestras (ver Fig. 5).

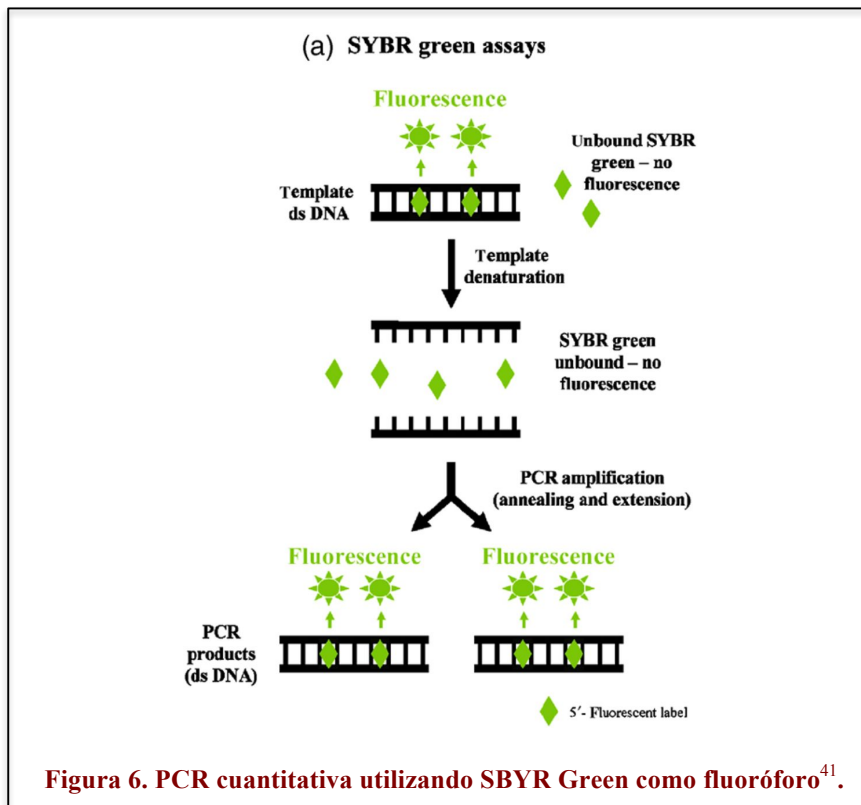
Para la IL-10 se utilizó otro kit de la casa comercial Diaclone® “Human IL-10 ELISA KIT” (Cat. No: 950.060.096). Este kit se basa en el mismo principio que el kit usado para la IL-6. Se siguió el protocolo establecido por la casa comercial³⁸ realizando una recta patrón y determinando así la concentración de IL-10 de las diferentes muestras.

Para la IL-1ra se utilizó un kit de la casa comercial Cusabio® “Human interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) ELISA Kit” (Catalog Number: CSB-E10396h). Este kit se basa en el mismo principio que los otros dos kits utilizados, la única diferencia es que el complejo utilizado es de avidina-HRP, a diferencia de los otros que utilizan un complejo de estreptavidina-HRP. Se siguió el protocolo establecido por la casa comercial³⁹ realizando una recta patrón y determinando así la concentración de IL-1ra de las diferentes muestras.



4.4 PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual a la vez que se amplifica la muestra del ácido nucleico de interés, éste se puede cuantificar. Los reactivos utilizados son los mismos que en la PCR convencional, pero se añade además un fluoróforo, el cual se unirá al ácido nucleico durante los diferentes ciclos de la qPCR, amplificando su señal de forma proporcional a la cantidad de muestra amplificada. En este estudio se utilizó el fluoróforo SYBR Green, este fluoróforo se une al ácido nucleico que se está amplificando justo en el momento en que está presente la doble hélice, es decir al final de cada ciclo de amplificación y antes de la desnaturalización, ya que se trata de un agente intercalante, que, excitado mediante luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) emite luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$), cuando se intercala entre las bases de la doble hélice del ADN (ver Fig. 6).



En este estudio se cuantificaron los siguientes genes de PBMCs circulantes: NF- κ B, COX2, IL-1 β y MnSOD. Previamente estos genes se retrotranscribieron a partir de sus ARNm, mediante una PCR de retrotranscripción (RT-PCR), ya que en este estudio se pretende medir la expresión génica. Se utilizó un kit de la casa comercial Condalab® “SYBR Green Takara” (Cat. 4RR420, Lot. AE90029N) para preparar la PCR-mix (SYBR Green, agua miliQ y dNTPs), así como la utilización de los respectivos *primers* (ver Tabla 2) en función del gen que queremos cuantificar. Tras esto se realizó la qPCR en una placa de 96 pocillos, incluyendo 7 μL de PCR-mix+*primers* y 3 μL de muestra, con sus respectivos ciclos y con una temperatura de *annealing* en función de cada primer (ver Tabla 2). Para la realización de la qPCR se utilizó el termociclador “Light cycler 480 II” de la casa comercial Roche® junto con el software “Light cycler 480 software reléase” y el programa “Detection format SYBR Green/HRM dye. Una vez realizada la qPCR de cada uno de los genes, se calcularon los puntos de corte o “crossing points” (Ct) de cada una de las muestras, comparándolas con una

muestra control (ARN ribosómico 18S) y se calculó el porcentaje de expresión relativa, siguiendo la siguiente formula:

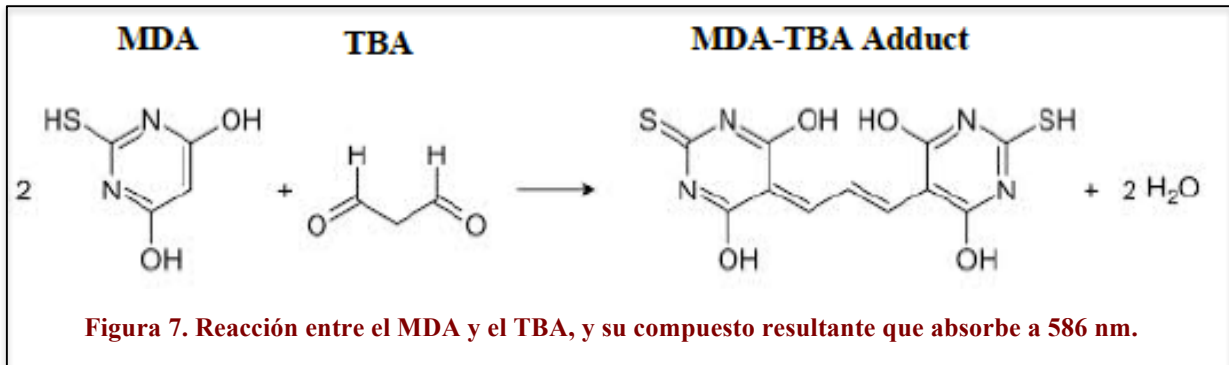
$$\%ER = \frac{e^{(media\ Ct(control)-media\ Ct(muestra))_{gen\ objetivo}}}{e^{(media\ Ct(control)-media\ Ct(muestra))_{gen\ referencia}}} \cdot 100$$

Tabla 2. Primers y condiciones de qPCR para el estudio de los genes

Gen	Primers	Desnaturalización	Cuantificación	Melting	Refrigeración
NF-κB	Fw: 5'- AAACACTGTGAGGA TGGGATCTG-3' Rv: 5'- CGAAGCCGACCACC ATGT-3'	1 ciclo 95 °C 5 min	50 ciclos 95 °C 10 s 60 °C 10 s 72 °C 15 s	1 ciclo 95 °C 5 s 65 °C 1 min 97 °C ∞	40 °C 10 s
COX2	Fw: 5'- TTGCCTGGCAGGGTT GCTGGTGGTA-3' Rv: 5'- CATCTGCCTGCTCTG GTCAATGGAA-3'		50 ciclos 95 °C 10 s 63 °C 10 s 72 °C 15 s		
IL-1β	Fw: 5'- GGACAGGATATGGA GCAACA-3' Rv: 5'- GGCAGACTCAAATT CCAGCT-3'		50 ciclos 95 °C 10 s 58 °C 10 s 72 °C 15 s		
MnSOD	Fw: 5'- CGTGCTCCCACACAT CAATC-3' Rv: 5'- TGAACGTCACCG AGGAGAAG-3'		50 ciclos 95 °C 10 s 60 °C 10 s 72 °C 15 s		

4.5 Cuantificación de malondialdehído mediante colorimetría

La peroxidación lipídica o lipoperoxidación hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre⁴². Uno de los productos formados durante este proceso es el MDA, en el procedimiento de su determinación primeramente se derivatiza el MDA de la muestra con 1-Metilo-2-fenilindol (TBA) y el producto es extraído, precipitando las proteínas en medio clorhídrico. El MDA reacciona con el TBA dando un producto que es cuantificable por espectrofotometría a una longitud de onda de 586 nm.



En este estudio diferentes muestras sanguíneas fueron tratadas según el protocolo establecido y tras ello el MDA resultante fue cuantificado mediante la reacción indicada más arriba (ver Fig.7) a una longitud de onda de 586 nm, utilizando una placa de 96 pocillos y cuantificando paralelamente la absorbancia de un patrón establecido.

5. Resultados

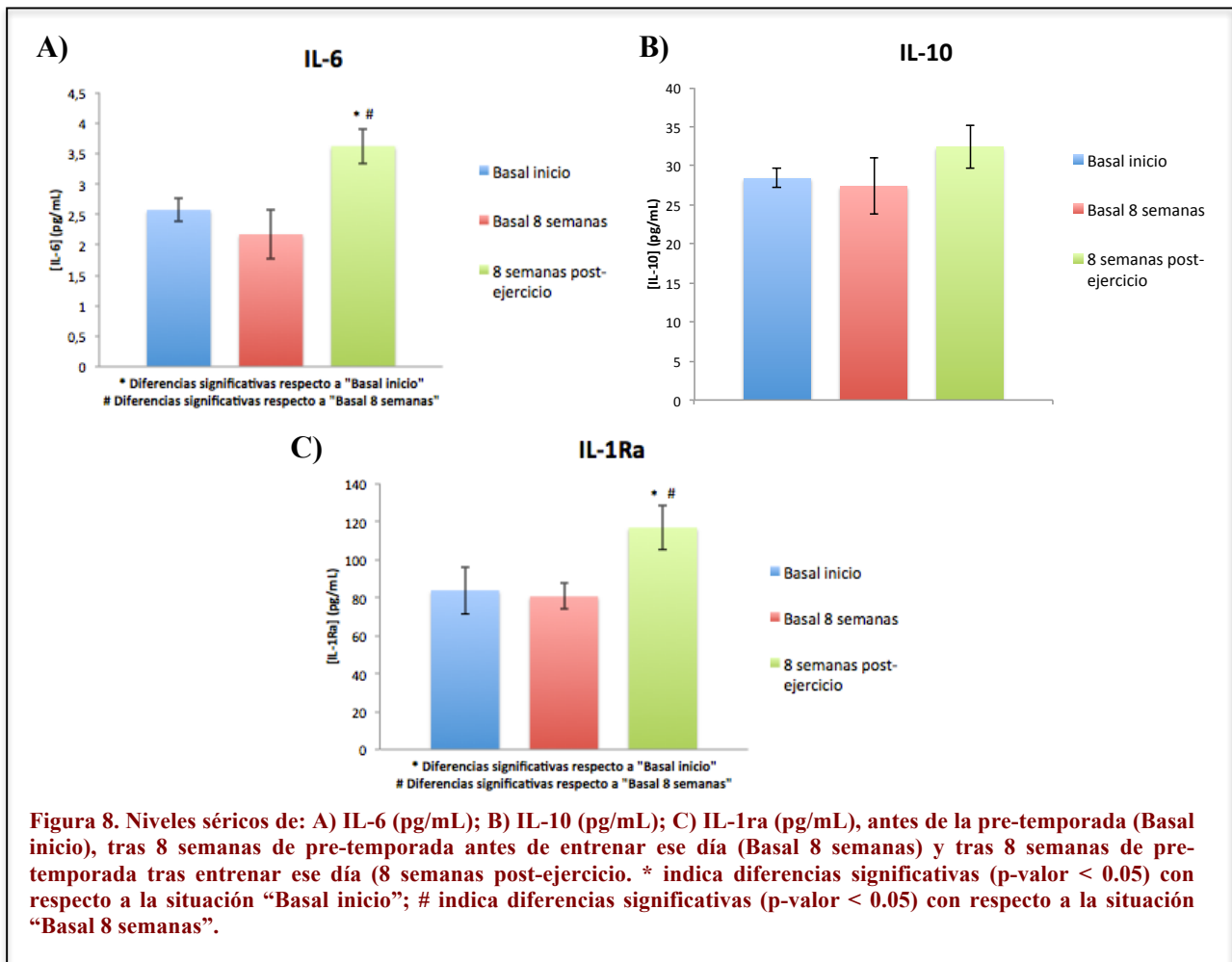
Todos los datos se expresan como la media±error estándar (3 cifras significativas). La distribución normal de los valores se evaluó mediante el test de Kolmogorov–Smirnov. La existencia de diferencias estadísticamente significativas se llevó a cabo mediante un *ANOVA de un factor* usando el programa *SPSS statistics*. Las diferencias se consideran significativas si el p-valor < 0,05.

5.1 Niveles circulantes de IL-6, IL-10 e IL-1ra

Al cuantificar los niveles circulantes de IL-6, como se puede observar en la figura, hay una bajada en la concentración en plasma en la situación “Basal 8 semanas” (2,17±0,41 pg/mL) con respecto a la situación “Basal inicio” (2,59±0,19 pg/mL), aunque a pesar de ello, esta bajada no es significativa. Por otro lado, dichos niveles vuelven a aumentar, esta vez sí de forma significativa, tras la realización del ejercicio en la situación “8 semanas post-ejercicio” (3,62±0,29 pg/mL), en comparación tanto con la situación “Basal inicio” como con la situación “Basal 8 semanas” (ver Fig. 8).

Por otro lado, los niveles de IL-10 se pudo observar que prácticamente no fluctuaban entre las diferentes situaciones. Se observa una pequeña disminución en la situación “Basal 8 semanas” (27,4±3,6 pg/mL) y tras esto un leve aumento en la situación “8 semanas post-ejercicio” (32,4±2,7 pg/mL), respecto a la situación “Basal inicio” (28,4±1,2 pg/mL), pero ninguna de estas fluctuaciones se puede considerar que sean significativas (ver Fig. 8).

Por último, los niveles circulantes de IL-1ra prácticamente no varían entre la situación “Basal inicio” (83,7±12,4 pg/mL) y la situación “Basal 8 semanas” (80,5±6,8 pg/mL), pero en la situación “8 semanas post-ejercicio” (116±12 pg/mL) se observa una subida significativa respecto a las otras dos situaciones (ver Fig. 8).



5.2 Niveles relativos de expresión génica: NF-κB, COX2, IL-1β y MnSOD

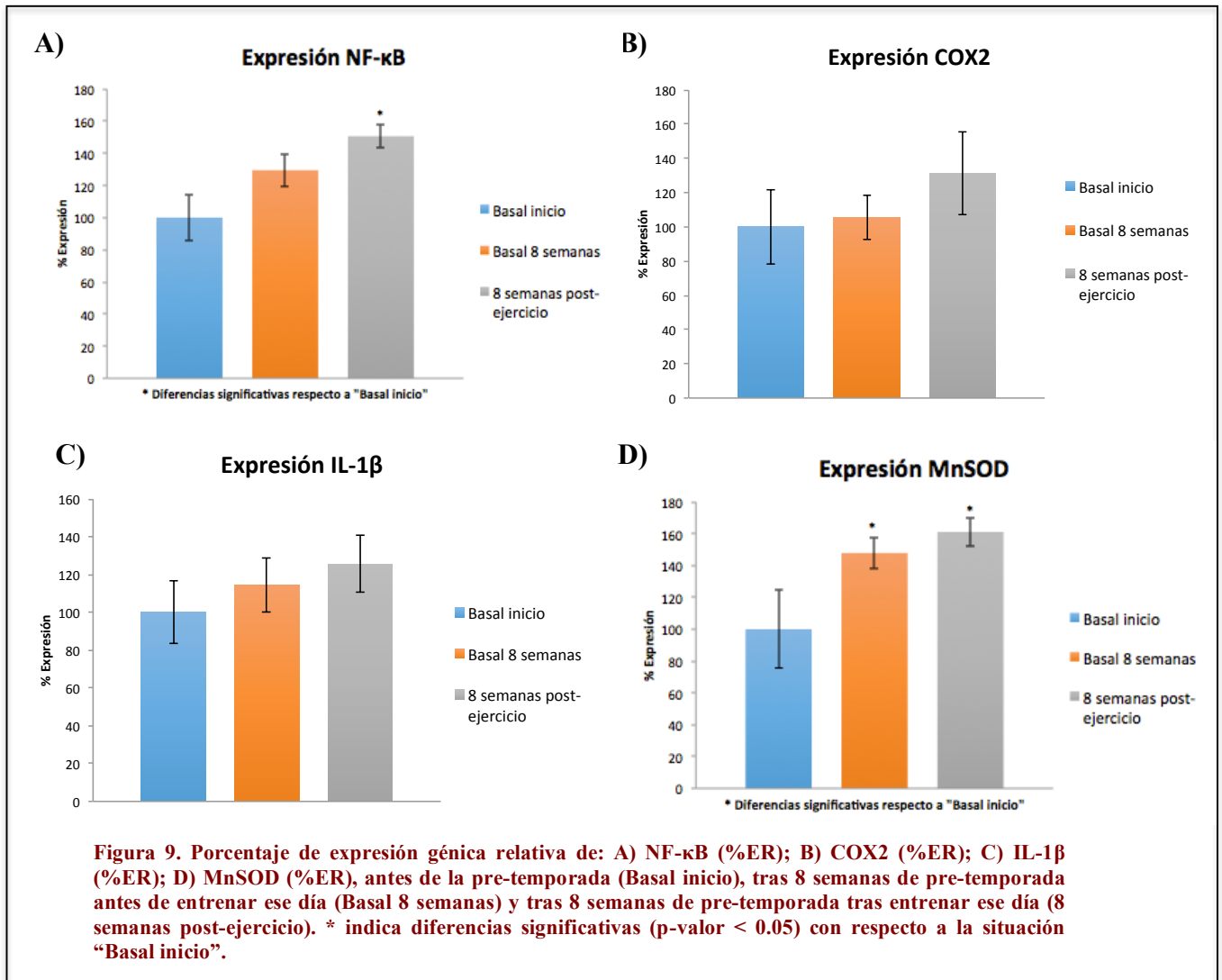
Respecto a los niveles de expresión relativa, estos fueron cuantificados en porcentajes relativos, partiendo de la situación “Basal inicio” como el 100 % en los PBMCs circulantes.

La expresión de NF-κB se puede observar cómo va aumentando progresivamente en la situación “Basal 8 semanas” (130±10 %) y en la situación “8 semanas post-ejercicio” (151±7 %) respecto a la situación “Basal inicio” (100±14 %), a pesar de ello tan solo es significativa la diferencia entre las dos situaciones más extremas (ver Fig. 9).

Sin embargo, la expresión de COX2 también aumenta progresivamente en la situación “Basal 8 semanas” (106±13 %) y en la situación “8 semanas post-ejercicio” (131±24 %) respecto a la situación “Basal inicio” (100±21 %), a pesar de ello ninguna de las diferencias es significativa debido seguramente a la alta variabilidad dentro de cada una de las situaciones (ver Fig.9).

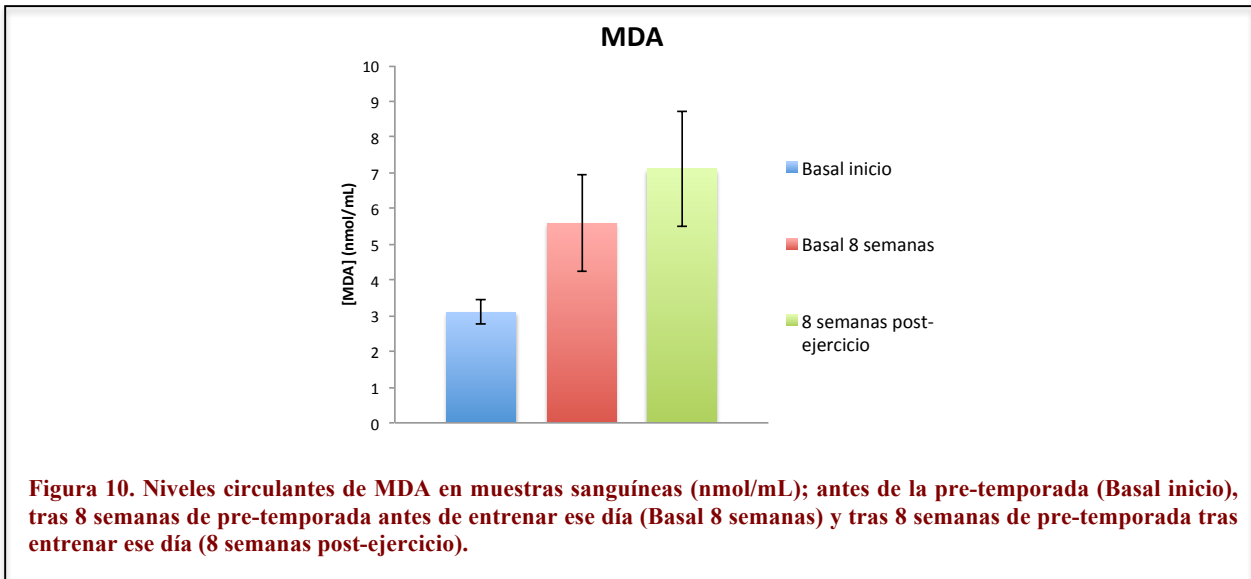
La misma situación se puede aplicar a la expresión de la IL-1β, ésta aumenta progresivamente en la situación “Basal 8 semanas” (115±14 %) y en la situación “8 semanas post-ejercicio” (126±15 %) respecto a la situación “Basal inicio” (100±16 %), pero al igual que sucedía con la expresión de COX2 ninguna de las diferencias es significativa (ver Fig. 9).

Sin embargo la expresión de MnSOD aumenta significativamente tanto en la situación “Basal 8 semanas” (148±9 %) como en la situación “8 semanas post-ejercicio” (161±8 %) respecto a la situación “Basal inicio” (100±24 %) (Ver Fig. 9).



5.3 Niveles circulantes de MDA

Cómo se ha mencionado antes el MDA es un marcador de peroxidación lipídica celular producido por los radicales libres que producen reacciones en cadena y acaban oxidando los lípidos de las membranas celulares. En este caso podemos observar como los niveles de MDA circulantes en sangre aumentan progresivamente a medida que realizamos ejercicio, tanto en la situación "Basal 8 semanas" ($5,58 \pm 1,35$ nmol/mL) como en la situación "8 semanas post-ejercicio" ($7,11 \pm 1,62$ nmol/mL), respecto a la situación "Basal inicio" ($3,10 \pm 0,33$ nmol/mL). A pesar de ello igual que sucede con otros parámetros comentados anteriormente estas diferencias no son significativas (ver Fig. 10).



6. Discusión

Cómo se ha comentado anteriormente, desde hace varios años, muchos estudios han demostrado que el ejercicio agudo, sobre todo si es intenso y/o extenuante, genera un aumento del proceso inflamatorio, así como de los mediadores moleculares asociados a éste. Mientras que estudios recientes han demostrado que el ejercicio regular, o a largo plazo, disminuye la intensidad del proceso inflamatorio, favoreciendo la secreción de mediadores moleculares que lo contrarrestan y en definitiva, favorecen el proceso de recuperación.

6.1 Niveles circulantes de IL-6, IL-10 e IL-1ra

Cómo se puede observar en este estudio los niveles de todas las interleucinas disminuyen, aunque no de forma significativa tras 8 semanas de ejercicio regular, mientras que cuando se realiza el ejercicio en ese mismo día, de forma aguda, sus niveles se disparan de forma significativa, tanto respecto a la situación inicial como antes del entreno (excepto para la IL-10). Es lógico pensar que los niveles de IL-6, IL-10 e IL-1ra sigan un mismo patrón de secreción, ya que como bien se ha mencionado anteriormente, la IL-6 promueve la secreción de IL-10 e IL-1ra³³. Un estudio demostró que la infusión de un análogo humano de la IL-6 por vía intravenosa generaba la secreción de IL-1ra y de IL-10, generando exactamente el mismo patrón, por lo que quedaría demostrado la teoría de que la IL-6 promueve la secreción de citoquinas anti-inflamatorias.

Estudios en personas con diferentes patologías inflamatorias crónicas, asociadas a la edad³⁰, han demostrado que la IL-6 disminuye cuando se realiza ejercicio regular y a largo plazo, mientras que estudios realizados en deportistas tras realizar un ejercicio a corto plazo extenuante³⁴, han demostrado que los niveles de IL-6 aumentan notablemente (ver Fig. 11). Puede pensarse que esto sea relativamente extraño, pero esto es debido a que la IL-6 es un arma de doble filo, ya que tiene un papel proinflamatorio si esta es generada por las PBMCs de forma crónica, mientras que si es generada de forma aguda por los miocitos tras un ejercicio físico posee un papel anti-inflamatorio. Por lo tanto sería lógico pensar que quizás la IL-6 está disminuida tras varios meses de entrenamiento regular debido a que se intenta atenuar su papel pro-inflamatorio, o que como el ejercicio regular promueve un perfil de citoquinas anti-inflamatorio, sus niveles se ven disminuidos porque el cuerpo se va adaptando

al entrenamiento y no necesita generar niveles más elevados en situación basal. Por otro lado, la producción de IL-6 está aumentada tras un ejercicio agudo y extenuante ya que el músculo está activo y genera una gran cantidad de mioquinas, por lo tanto se potenciaría su papel anti-inflamatorio, evitando así que el músculo se inflame, induciendo a su vez la producción y liberación de altos niveles de IL-10 e IL-1ra. También se ha demostrado que la IL-6 es capaz de disminuir los altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como puede ser el TNF- α ⁷.

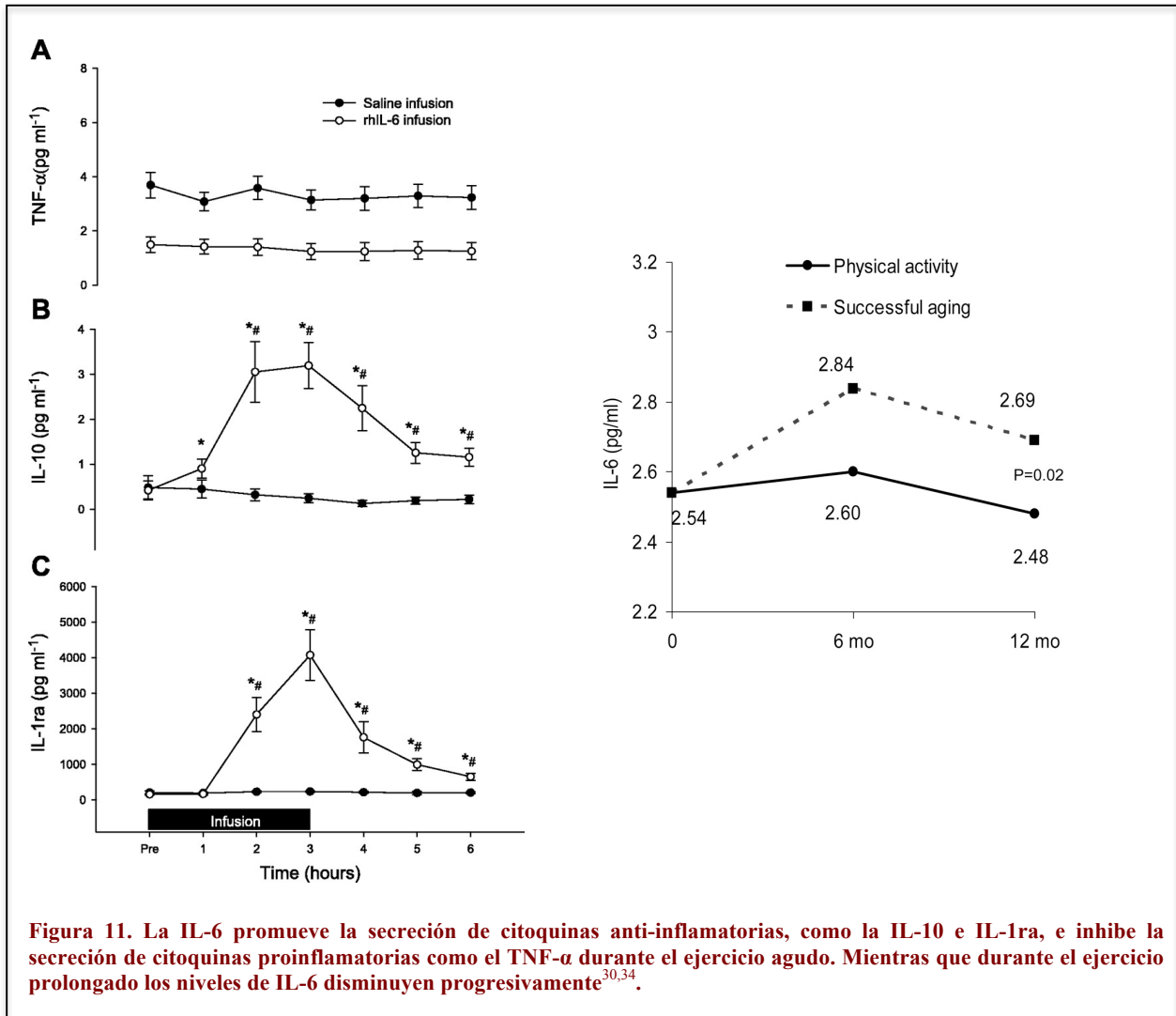
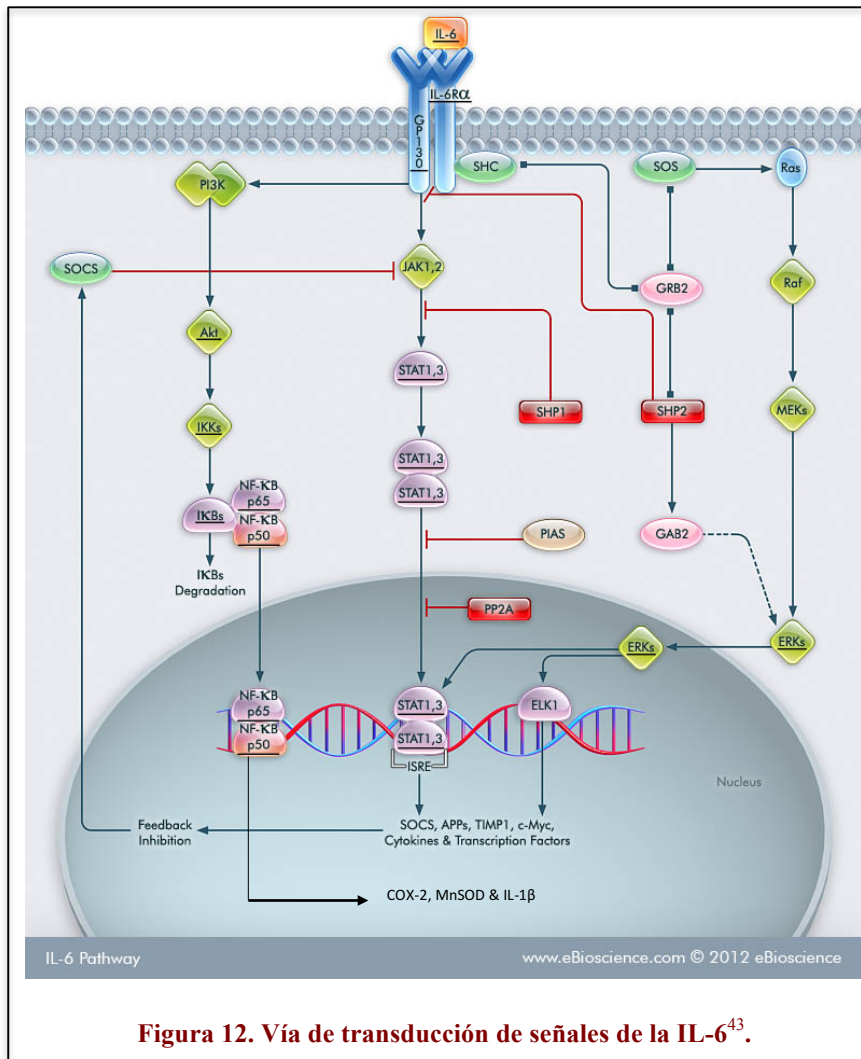


Figura 11. La IL-6 promueve la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10 e IL-1ra, e inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α durante el ejercicio agudo. Mientras que durante el ejercicio prolongado los niveles de IL-6 disminuyen progresivamente^{30,34}.

En conclusión, el ejercicio regular protege contra la inflamación sistémica crónica de grado bajo asociada al ejercicio. Este efecto a largo plazo del ejercicio puede ser atribuido a la respuesta antiinflamatoria provocada por el ejercicio agudo, que está parcialmente mediado por las citoquinas derivadas del músculo como la IL-6. Concentraciones fisiológicas de IL-6 estimulan la aparición en la circulación de las citoquinas antiinflamatorias IL-1ra y la IL-10; e inhiben la producción de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α . Por otra parte, la IL-6 estimula la lipólisis, así como la oxidación de grasas. Los efectos anti-inflamatorios del ejercicio pueden ofrecer protección contra la resistencia a la insulina inducida por TNF- α . Aquí se sugiere que las mioquinas pueden estar implicadas en la mediación de los efectos beneficiosos para la salud del ejercicio y juegan un papel importante en la adecuación física al ejercicio regular.

6.2 Niveles relativos de expresión génica: NF-κB, COX2, IL-1β y MnSOD

Frente a un estímulo estresante como es el ejercicio, es lógico que se secreten citoquinas por parte de los miocitos como puede ser la IL-6. Además se sabe que la IL-6 es capaz de activar la vía de NF-κB en los PBMCs que han sido reclutados frente al estímulo estresante. Cuando la vía de NF-κB se activa, produce el aumento de la expresión de genes tanto pro como anti-inflamatorios, para combatir al estímulo estresante. Entre los genes activados por esta vía están los genes que codifican para la IL-1β, para la COX2 y para la MnSOD (ver Fig. 12).



Por lo tanto, es lógico que ante un aumento de IL-6 todos los genes de los cuales hemos cuantificado su expresión aumenten. Como podemos observar los únicos incrementos significativos que se observan en este estudio son en el gen del propio NF-κB y en la MnSOD. Estos resultados nos podrían llevar a pensar que realmente la IL-6 tiene un papel anti-inflamatorio por dos motivos principalmente: en primer lugar, tanto la IL-1β como la COX2 codifican para proteínas que tienen un papel proinflamatorio. La IL-1β es un miembro de la familia de la IL-1. Esta citoquina es producida por macrófagos activados como una pro-proteína, que se procesa proteolíticamente en su forma activa por la caspasa 1 (CASP1). Esta citoquina es un mediador importante de la respuesta inflamatoria, y está implicado en una variedad de actividades celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación y apoptosis.

Mientras que la COX-2 es una enzima que metaboliza el AA dando lugar a numerosos compuestos pro-inflamatorios como las prostaglandinas. Se ha observado que ambas aumentan de forma progresiva durante el ejercicio tanto prolongado como agudo, pero ninguna de ellas aumenta de forma significativa. Por lo tanto podemos afirmar que ninguno de los genes pro-inflamatorios aumentan hasta tal punto de generar una posible inflamación, por lo que la inflamación no ha aumentado de forma significativa.

En segundo lugar, la MnSOD, como miembro de la familia superóxido dismutasa de manganeso, transforma el radical superóxido tóxico, un subproducto de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, en peróxido de hidrógeno y oxígeno diatómico⁴⁴. Esta función permite a la MnSOD eliminar y, como resultado, conferir protección contra la muerte celular⁴⁵. Como resultado de ello, esta proteína juega un papel antiapoptótico y protege contra el estrés oxidativo, la radiación ionizante, y las citoquinas inflamatorias. Se ha observado que la expresión de este gen sí que aumenta de forma significativa. Por lo tanto podríamos decir que la expresión de genes anti-inflamatorios aumenta de forma significativa en el ejercicio agudo, pero no en el prolongado (aunque aumenta pero no de forma significativa).

De forma general, tras el análisis de la expresión génica, podemos decir que el patrón de expresión génica es común en todos los genes debido a los altos niveles de IL-6 y a su mediación a través de la vía de NF-κB, que activa a la par la expresión de los genes que codifican para la IL-1β, COX-2 y MnSOD. Pero aunque el aumento sea progresivo en la expresión de todos los genes únicamente dos aumentan de forma significativa: el propio NF-κB ya que es el que media toda la vía de señalización y la MnSOD que tiene un papel anti-inflamatorio. Mientras que los genes que codifican para proteínas con un papel pro-inflamatorio se ve aumentado pero no de forma significativa. En conclusión: los genes pro-inflamatorios no se ven aumentados significativamente tras el ejercicio agudo ni prolongado, mientras que los genes anti-inflamatorios no se ven aumentados de forma significativa tras el ejercicio prolongado, pero si tras el agudo; todo ello favorece un perfil anti-inflamatorio durante la realización del ejercicio agudo.

6.3 Niveles circulantes de MDA

Como bien se ha descrito anteriormente, los niveles de MDA aumentan tras el ejercicio regular y sobretodo tras el ejercicio agudo. Esto es debido a que durante el ejercicio la producción de ROS aumenta notablemente, generando así peroxidación lipídica en los diferentes lípidos circulantes. Lo que es realmente interesante es que el aumento de estos niveles no sea significativo para ninguna de las dos situaciones, pese a observarse claramente en los resultados como este aumenta entre situaciones.

Algunos estudios⁴⁶ han demostrado que los niveles de MDA aumentan significativamente tras el ejercicio agudo, pero tras varios días de ejercicio regular estos niveles van disminuyendo pero nunca llegan a ser los valores basales iniciales antes de haber realizado el ejercicio.

Hay que pensar que los individuos de este estudio entrenan varios días por semana, por lo que los niveles de MDA estarán aumentados, aunque no de forma significativa, tras el ejercicio

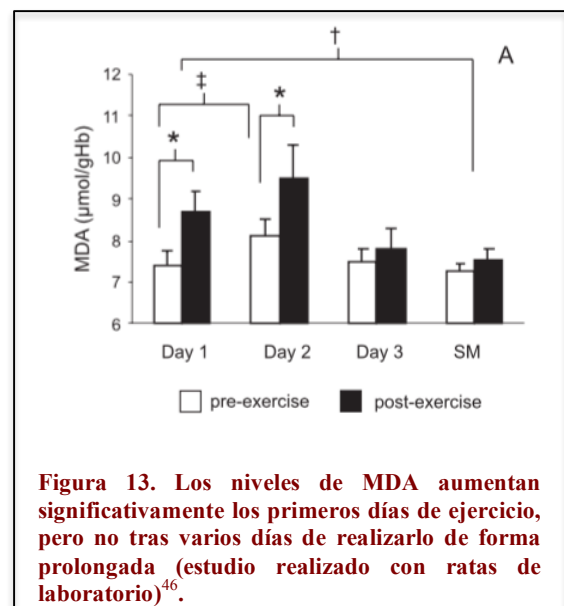


Figura 13. Los niveles de MDA aumentan significativamente los primeros días de ejercicio, pero no tras varios días de realizarlo de forma prolongada (estudio realizado con ratas de laboratorio)⁴⁶.

regular (ver Fig. 13). Sin embargo los altos niveles tras el ejercicio agudo sí que deberían ser significativamente más elevados respecto al punto inicial. Una de las posibles causas de que el aumento tras el ejercicio agudo no haya sido significativo es que los estudios anteriormente mencionados son estudios realizados en ratas de laboratorio, en las cuales las condiciones son mucho más fáciles de controlar y la variabilidad entre individuos es mucho menor. Mientras que en el presente estudio los individuos son seres humanos cuya variabilidad tanto genética como ambiental afecta mucho a los valores del estudio, dando lugar a esa alta variabilidad que se observa en los resultados.

Sin embargo, un estudio realizado en seres humanos; cuyo objetivo fue determinar si la resistencia aguda asociada ejercicio aumenta los niveles séricos de MDA después del ejercicio. Creo dos grupos de doce hombres no entrenados (UT) y doce hombres entrenados (RT). Todos los sujetos completaron un protocolo de ejercicio de resistencia y las muestras de sangre se obtuvieron antes del ejercicio, a los 5 minutos después del ejercicio, y a las 6, 24 y 48 horas después del ejercicio. En pre-ejercicio, se hallaron niveles de MDA (con un promedio de $3,41 \pm 0,25$ (RT) y $3,20 \pm 0,25$ (UT) y no difirieron ($p > 0,05$) ni entre los grupos o con el tiempo. Este estudio indicó que el ejercicio de resistencia de intensidad moderada no tuvo ningún efecto sobre la concentración sérica de MDA en sujetos RT y UT, ni con la duración del tiempo⁴⁷.

7. Conclusión

Cómo conclusiones finales de este trabajo de fin de grado, se han podido abstraer los siguientes conceptos que resultan más relevantes:

- Durante la realización de ejercicio agudo la propia contracción muscular junto con el aumento del consumo de oxígeno incrementa la producción de especies reactivas y favorece la producción de citoquinas pro-inflamatorias, que podría estar relacionado con una situación temporal de estrés oxidativo.
- La práctica regular de ejercicio físico promueve un patrón de secreción de citoquinas anti-inflamatorias concreto, y además, favorece la aparición un perfil anti-inflamatorio que se activa de manera más eficaz durante el ejercicio agudo, favoreciendo el proceso de recuperación tras el mismo.
- El ejercicio regular promueve la expresión de genes que codifican para proteínas, como citoquinas y enzimas, que promueven una acción anti-inflamatoria y antioxidante. A su vez no promueve el aumento significativo de genes que codifican para proteínas con un papel proinflamatorio.
- El ejercicio agudo induce el aumento de marcadores de estrés oxidativo como el MDA, este aumento puede ser significativo tras la realización de un ejercicio agudo y extenuante, sin embargo la práctica regular de ejercicio físico reduce de forma notable estos incrementos.

En resumen, el ejercicio agudo promueve un perfil proinflamatorio, mientras que el ejercicio prolongado promueve un perfil anti-inflamatorio; ya sea promoviendo la secreción de citoquinas anti-inflamatorias durante el ejercicio agudo para paliar el efecto pro-inflamatorio de otros mediadores moleculares o activando la expresión génica de enzimas que poseen un papel protector.

Bibliografia

1. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(2):227-235. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x.
2. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System.* Vol 2012.; 2012.
https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=jOwdl_MEr7sC&pgis=1. Accessed March 19, 2016.
3. Artritis reumatoide-Generalidades.
<http://webs.ono.com/artreide/remicade/infliximab/2.html>. Accessed May 3, 2016.
4. Gianotti M. Apuntes Patología Molecular. 2016.
5. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition.*; 2014.
<https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=jJlBAAAQBAJ&pgis=1>. Accessed March 20, 2016.
6. Widgerow AD. Cellular resolution of inflammation--catabasis. *Wound Repair Regen.* 20(1):2-7. doi:10.1111/j.1524-475X.2011.00754.x.
7. Petersen a. MW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005;98:1154-1162. doi:10.1152/jappphysiol.00164.2004.
8. Kuipers H. Exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med.* 1994;15(3):132-135. doi:10.1055/s-2007-1021034.
9. Pedersen BK. Muscle as a secretory organ. *Compr Physiol.* 2013;3(3):1337-1362. doi:10.1002/cphy.c120033.
10. Benatti FB, Pedersen BK. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases—myokine regulation. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;11(2):86-97. doi:10.1038/nrrheum.2014.193.
11. Wilmore J, Costill D, Gleim G. Physiology of Sport and Exercise. *Med Sci Sport Exerc.* 1995.
<https://scholar.google.es/scholar?cluster=1710677205033110119&hl=es&oi=scholar&sa=X&ved=0ahUKEwjbmCnx9HLAhVG1hQKHBYBFCJEQgAMiHCgAMAA#0>. Accessed March 21, 2016.
12. Eston RG, Mickleborough J, Baltzopoulos V. Eccentric activation and muscle damage: biomechanical and physiological considerations during downhill running. *Br J Sports Med.* 1995;29(2):89-94.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1332286&tool=pmcentrez>

- &rendertype=abstract. Accessed March 21, 2016.
13. Semmler JG. Motor unit activity after eccentric exercise and muscle damage in humans. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;210(4):754-767. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24761463>. Accessed March 21, 2016.
 14. Toth MJ, Matthews DE, Tracy RP, Previs MJ. Age-related differences in skeletal muscle protein synthesis: relation to markers of immune activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(5):E883-E891. doi:10.1152/ajpendo.00353.2004.
 15. Trappe TA, White F, Lambert CP, Cesar D, Hellerstein M, Evans WJ. Effect of ibuprofen and acetaminophen on postexercise muscle protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(3):E551-E556. doi:10.1152/ajpendo.00352.2001.
 16. Marimuthu K, Murton AJ, Greenhaff PL. Mechanisms regulating muscle mass during disuse atrophy and rehabilitation in humans. *J Appl Physiol*. 2011;110(2):555-560. doi:10.1152/jappphysiol.00962.2010.
 17. Cannon JG, Pierre BA St. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem*. 179(1-2):159-168. doi:10.1023/A:1006828425418.
 18. Lang CH, Hong-Brown L, Frost RA. Cytokine inhibition of JAK-STAT signaling: a new mechanism of growth hormone resistance. *Pediatr Nephrol*. 2005;20(3):306-312. doi:10.1007/s00467-004-1607-9.
 19. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med*. 2000;34(4):246-251. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1724218&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed March 21, 2016.
 20. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol*. 1997;499 (Pt 3):833-841. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1159298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed March 19, 2016.
 21. McKay BR, De Lisio M, Johnston APW, et al. Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. *PLoS One*. 2009;4(6):e6027. doi:10.1371/journal.pone.0006027.
 22. MacIntyre DL, Sorichter S, Mair J, Berg A, McKenzie DC. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2001;84(3):180-186. doi:10.1007/s004210170002.
 23. Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2007;103(5):1744-1751. doi:10.1152/jappphysiol.00679.2007.
 24. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is

- an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 2008;7(1):33-44. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.011.
25. Mikkelsen UR, Schjerling P, Helmark IC, et al. Local NSAID infusion does not affect protein synthesis and gene expression in human muscle after eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports.* 2011;21(5):630-644. doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01170.x.
 26. McFarlin BK, Flynn MG, Phillips MD, Stewart LK, Timmerman KL. Chronic Resistance Exercise Training Improves Natural Killer Cell Activity in Older Women. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2005;60(10):1315-1318. doi:10.1093/gerona/60.10.1315.
 27. Stewart LK, Flynn MG, Campbell WW, et al. Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain Behav Immun.* 2005;19(5):389-397. doi:10.1016/j.bbi.2005.04.003.
 28. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1055-1081. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893431>. Accessed March 10, 2016.
 29. Ploeger HE, Takken T, de Greef MHG, Timmons BW. The effects of acute and chronic exercise on inflammatory markers in children and adults with a chronic inflammatory disease: a systematic review. *Exerc Immunol Rev.* 2009;15:6-41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19957870>. Accessed March 11, 2016.
 30. Nicklas BJ, Hsu F-C, Brinkley TJ, et al. Exercise training and plasma C-reactive protein and interleukin-6 in elderly people. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56(11):2045-2052. doi:10.1111/j.1532-5415.2008.01994.x.
 31. Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, Pence BD. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol.* 2008;84(5):1271-1278. doi:10.1189/jlb.0408244.
 32. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, et al. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(2):348-355. doi:10.1249/01.MSS.0000048861.57899.04.
 33. Brandt C, Pedersen BK. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:520258. doi:10.1155/2010/520258.
 34. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(2):E433-E437. doi:10.1152/ajpendo.00074.2003.
 35. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - MeSH - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=elisa>. Accessed April 23, 2016.

36. ELISA Pairs Kits - Resources - Support - Abnova.
<http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7B70196CA1-59B1-40D0-8394-19F533EB108F%7D>. Accessed April 23, 2016.
37. Human IL-6 ELISA Kit. <http://www.diaclone.com/uploads/File/downloads/950030HumanIL%2D6ELISAkitinsertv9%281%29%2Epdf>. Accessed April 23, 2016.
38. Human IL-10 ELISA Kit. <http://www.diaclone.com/uploads/File/downloads/950060HumanIL%2D10ELISAkitinsertV9%2Epdf>. Accessed April 23, 2016.
39. Human IL-1ra ELISA Kit.
http://www.cusabio.com/uploadfile/newwell/Instructions/CSB-E10396h_Human_Interleukin_1_receptor_antagonist_IL-1ra_ELISA_kit.pdf.
Accessed April 28, 2016.
40. Biotin-Streptavidin/HRP ELISA image.
<http://www.epitomics.com/images/products/sandwich.jpg>. Accessed April 23, 2016.
41. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009;67(1):6-20.
doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
42. Cabrera García CE, Robles Cairo EE. Evaluación del efecto antioxidante del ejercicio moderado y continuo en individuos con entrenamiento físico regular. 2010.
43. IL-6 Pathway. <http://www.ebioscience.com/resources/pathways/il-6-pathway.htm>.
Accessed May 6, 2016.
44. SOD2 superoxide dismutase 2, mitochondrial [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6648>. Accessed May 6, 2016.
45. Pias EK, Ekshyyan OY, Rhoads CA, Fuseler J, Harrison L, Aw TY. Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells. *J Biol Chem.* 2003;278(15):13294-13301. doi:10.1074/jbc.M208670200.
46. Shing CMSM, Peake JMPM, Ahern SMAM, et al. The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab.* June 2007.
http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/H07-051?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed#.VyyoB2OlzKo.
Accessed May 6, 2016.
47. Dixon CB, Robertson RJ, Goss FL, Timmer JM, Nagle EF, Evans RW. The effect of acute resistance exercise on serum malondialdehyde in resistance-trained and untrained collegiate men. *J Strength Cond Res.* 2006;20(3):693-698. doi:10.1519/R-15854.1.