



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Capacidad antioxidante en plasma de personas mayores: influencia de la actividad física

Miguel Ángel Morata Juan

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2015 – 16

DNI de l'alumne: 43202754Z

Treball tutelat per Silvia Tejada Gavela  
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:

Antioxidantes, ejercicio regular, vitaminas, estado redox, estrés oxidativo, envejecimiento.



## Índice

### Resumen

#### 1. Introducción

- 1.1 Paradoja del oxígeno
- 1.2 Oxidantes y antioxidantes
  - 1.2.1 *Equilibrio redox*
  - 1.2.2 *Ejemplos de oxidantes y antioxidantes*
- 1.3 Estrés oxidativo durante el ejercicio
- 1.4 Ejercicio, edad y estrés oxidativo
- 1.5 Medición del estrés oxidativo

#### 2. Hipótesis y objetivos

- 2.1 Hipótesis
- 2.2 Objetivos

#### 3. Materiales y métodos

- 3.1 Diseño experimental
- 3.2 Determinación de MDA
- 3.3 Determinación de actividades enzimáticas
- 3.4 Determinación de polifenoles
- 3.5 Determinación de la capacidad antioxidante (FRAP)
- 3.6 Análisis estadístico

#### 4. Resultados

#### 5. Discusión

#### 6. Conclusiones

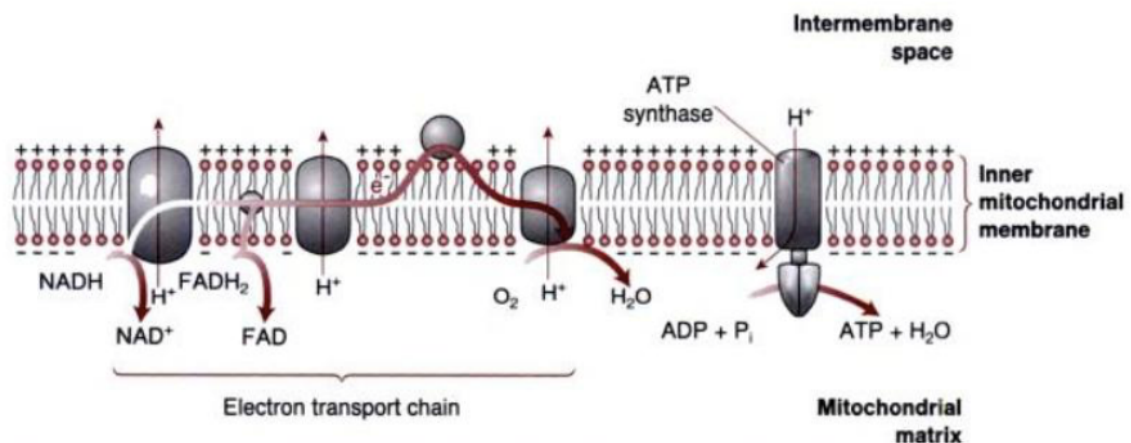
#### 7. Referencias

## Resumen

A la vez que la molécula de oxígeno permite la producción de energía en la célula, produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que conllevan a una serie de cambios bioquímicos indicativos de estrés oxidativo. A medida que aumenta la fosforilación oxidativa en respuesta al ejercicio, habrá un aumento concomitante de los radicales libres. Para hacer frente a este entorno, se han desarrollado una serie de compuestos antioxidantes y enzimas reparadoras. En el presente trabajo se examina un marcador de daño oxidativo (malondialdehído: MDA), dos enzimas antioxidantes endógenas (catalasa: CAT, y superóxido dismutasa: SOD), así como una enzima prooxidativa (mieloperoxidasa: MPO). También se determina la capacidad antioxidante a través del método de FRAP y un antioxidante exógeno (polifenoles). Los parámetros fueron medidos en un total de 72 individuos, tanto hombres como mujeres, contando con un grupo control y un grupo activo físicamente para cada género. En los sujetos que realizan ejercicio físico regular se observa un descenso del estrés oxidativo y, consiguientemente, del daño oxidativo. Las defensas antioxidantes endógenas sufren adaptación incrementando su actividad tras el ejercicio regular, así como la capacidad antioxidante total (FRAP). La actividad de los antioxidantes exógenos es independiente del ejercicio físico. Los resultados en sujetos activos sugieren que el sistema antioxidante adquiere eficacia frente a la mayor producción de radicales libres durante el ejercicio regular en individuos de edad avanzada respecto a individuos sedentarios.

## 1. Introducción

El oxígeno presente en la atmósfera es la base de la vida en la Tierra, los organismos aeróbicos eucariotas superiores no pueden existir sin la presencia del mismo <sup>1</sup>. Ello viene justificado por el hecho de que el sistema oxidativo es el sistema final de producción de energía en la célula, mediante el cual el cuerpo descompone combustibles con la ayuda de oxígeno para generar energía (ATP: 5' – trifosfato). El mecanismo para la producción del trifosfato es a través de la cadena de transporte de electrones por reacciones redox, las cuales consiguen crear un gradiente electroquímico utilizado para sintetizar dicha molécula contenedora de enlaces fosfato. Los electrones provienen de un donador de electrones como es el NADH o FADH<sub>2</sub>, pasan por la cadena de transporte electrónico y llega a un aceptor como el O<sub>2</sub> (principal aceptor de electrones) <sup>2</sup>. Estos donadores de electrones previamente han captado electrones de sustratos como pueden ser el piruvato o el malato. Los electrones recorren los complejos proteicos (I, III y IV), la coenzima Q y el citocromo C hasta llegar al aceptor final (O<sub>2</sub>). La energía producida es utilizada por los complejos para el transporte activo de protones (H<sup>+</sup>) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Se crea un gradiente electroquímico a través de la membrana que solo se puede reestablecer si los protones retornan a la matriz a través de la ATP sintasa. El transporte de H<sup>+</sup> a través de la enzima provoca su activación, lo que resulta en la producción de energía útil gracias a la fosforilación de ADP (catalizado por la ATP sintasa). Se puede observar el esquema del proceso en la Fig. 1.



**Fig. 1. Esquema de la cadena transportadora de electrones y ATP sintasa.** En la imagen se observa el flujo de electrones desde el NADH hasta el O<sub>2</sub>. Los complejos proteicos que construyen la cadena (I, III y IV) se localizan en la membrana interna mitocondrial. H<sup>+</sup>: protón. Imagen de la referencia bibliográfica <sup>3</sup>.

### 1.1. Paradoja del oxígeno

Debido a la necesidad de estos organismos por el oxígeno, es paradójico el hecho de que resulte inherentemente peligroso para la existencia de los mismos. A este hecho se le conoce como 'paradoja de la vida eucariota' o 'paradoja del oxígeno' <sup>4</sup>. La razón por la que el oxígeno resulta perjudicial se encuentra directamente relacionada con el hecho de que cada uno de estos átomos tiene un electrón no apareado en su capa de valencia exterior, dos en el caso del oxígeno molecular al ser un átomo divalente. Esto último clasifica al átomo de oxígeno en un radical libre y a su molécula en un bi-radical libre.

La reducción de oxígeno por la cadena de transporte de electrones mitocondrial, para producir agua, se considera un proceso relativamente seguro; en cambio, la reducción univalente del oxígeno genera intermediarios reactivos. Éste último se produce con frecuencia sin que esté programado debido al ambiente reductor del medio celular <sup>4</sup>. Alrededor de un 2-5 % del oxígeno empleado en la mitocondria se transforma en radicales libres <sup>5</sup>. El radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales de hidroxilo ( $OH^-$ ) son algunos de los productos más comunes generados como consecuencia del ambiente aeróbico y considerados responsables de la toxicidad del oxígeno.

Para poder sobrevivir en dicho entorno, los organismos vivos han desarrollado una variedad de compuestos antioxidantes con la capacidad de actuar en ambientes lipídicos y acuosos; además cuentan con unas enzimas con capacidad antioxidante que pueden interceptar e inactivar intermediarios reactivos del oxígeno. Aún con estas barreras defensivas, el organismo no es completamente eficaz a la hora de prevenir el daño oxidativo, y proteínas, lípidos y material genético pueden verse afectados. Por ello, el organismo sintetiza enzimas reparadoras del daño celular. Debido a que los niveles de estrés oxidativo pueden fluctuar en el tiempo, los organismos son capaces de adaptarse induciendo en mayor o menor medida la síntesis de estas enzimas antioxidantes y de reparación. Sin embargo, aun con todos estos mecanismos presentes en la naturaleza, el daño oxidativo sigue siendo un resultado inevitable de la existencia de la vida aerobia<sup>4</sup>.

En los últimos años de estudio, se ha relacionado el estrés oxidativo con una amplia variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes (como la mutagénesis, la transformación celular y el cáncer <sup>6,7</sup>, la aterosclerosis, ataques cardíacos, lesiones por isquemia <sup>8</sup> y enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide o agudas como las cataratas <sup>9</sup>). Una amplia variedad de trastornos relacionados con el envejecimiento como el Parkinson <sup>10</sup> o el Alzheimer <sup>11</sup>

también estarían relacionados con el daño celular. Éste podría iniciar o agravar dichas enfermedades, debido a todos los ambientes pro-oxidantes y/o drogas pro-oxidantes y alimentos, entre otros factores <sup>4</sup>.

## 1.2. Oxidantes y antioxidantes

En numerosos procesos enzimáticos el oxígeno es reducido por la transferencia de un electrón a diferentes compuestos:  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el oxígeno singlete. Estos compuestos reciben el nombre de especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés 'reactive oxygen species') y son una familia de moléculas generadas de modo continuo, que son capaces de ser transformadas y consumidas en todo organismo vivo <sup>12</sup>. En dosis bajas, las ROS poseen un papel fundamental en muchas funciones fisiológicas, tales como la señalización celular, la expresión génica, la regulación de las respuestas inmunes y el fomento de los mecanismos de defensa antioxidantes, pero a concentraciones elevadas, son compuestos tóxicos que conducen a la peroxidación de lípidos y la oxidación de otras biomoléculas sensibles, tales como proteínas y ADN <sup>13, 1</sup>.

Los seres humanos viven en presencia de varios factores de estrés ambiental ubicuos incluyendo la radiación ultravioleta, los microbios, alérgenos y diversos contaminantes, tales como aumento de ozono, humo de cigarrillos o los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que pueden amplificar la generación de estas especies ROS en el cuerpo <sup>13</sup>.

Por otro lado, los antioxidantes se conocen como aquellas especies moleculares que son capaces de prevenir, retrasar o reparar el daño oxidativo causado y actuar como captadores de estas ROS; de modo que los antioxidantes previenen y reparan el daño celular y molecular <sup>12</sup>.

## Equilibrio redox

Se considera crítico el equilibrio entre la oxidación y los antioxidantes para el mantenimiento de los organismos dentro de niveles normales. El sistema de defensa antioxidante humano, como por ejemplo las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX) o la especie molecular glutatión (GSH), en condiciones fisiológicas, permite la eliminación de este exceso de ROS.

Sin embargo, estos antioxidantes propios del organismo (conocidos como antioxidantes endógenos) constituyen una defensa incompleta sin la presencia de antioxidantes exógenos (como son la

vitamina E, C, polifenoles y carotenoides). Estos dos tipos de antioxidantes actúan de forma interactiva para mantener o reestablecer la homeostasis redox. Esta interacción puede ser sinérgica, como por ejemplo cuando el GSH (antioxidante endógeno) regenera la vitamina E (antioxidante exógeno) o vitamina C para prevenir los procesos de peroxidación lipídica.

Durante el estrés oxidativo la célula entra en un estado caracterizado por el desequilibrio entre la producción de oxidantes y la protección antioxidante, a favor de los primeros. Como resultado al desequilibrio, los radicales atacan a los componentes celulares, especialmente a los lípidos. Cuando los ácidos grasos poliinsaturados de la biomembrana son atacados, ocurre una reacción en cadena llamada peroxidación lipídica, que conduce a la generación de más radicales que pueden dañar a otros componentes celulares <sup>5</sup>.

Es decir, el estrés oxidativo puede causar disfunción celular mediante la inducción de cambios en la expresión génica, proteica, señalización celular, fluidez de membrana o incluso provocar la muerte celular <sup>13</sup>.

#### Ejemplos de oxidantes y antioxidantes

Como se ha comentado con anterioridad, en el grupo de las ROS se incluyen el  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , oxígeno singlete y especies reactivas de nitrógeno obtenidas a partir de la reacción de otras ROS con óxido nítrico <sup>14</sup>. Pero por otro lado, no solo se consideran antioxidantes aquellas sustancias que eliminan las ROS, sino también las que actúan como antioxidantes con capacidad de evitar la producción enzimática de dichas especies (como por ejemplo las que actúan sobre la enzima NADPH oxidasa) y compuestos que inducen las defensas antioxidantes. En la Fig. 2 se puede observar una clasificación de los distintos antioxidantes según sean exógenos o endógenos, además de algunos de los cofactores necesarios para la acción de las enzimas antioxidantes.



AO exógenos	AO endógenos	Cofactores AO
<ul style="list-style-type: none"><li>•Vit E</li><li>•Vit C</li><li>•Betacarotenos</li><li>•Flavonoides</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Glutation</li><li>•Coenzima Q</li><li>•Ácido tióctico</li><li>•Enzimas: SOD CAT GPX MPO</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Cobre</li><li>•Zinc</li><li>•Magnesio</li><li>•Selenio</li></ul>

**Fig. 2. Clasificación de los principales antioxidantes según su origen, incluyendo enzimas y cofactores (AO: antioxidante, Vit: Vitamina, SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, GPX: glutatión peroxidasa, MPO: mieloperoxidasa).**

▪ Vitamina E

La vitamina E es un antioxidante exógeno al que la mayoría de veces se le asocia con cualquier tipo de tocoferol (pero estrictamente solo engloba al  $\alpha$ -tocoferol). Su poder antioxidante es muy efectivo para la protección de los ácidos grasos insaturados; además, estabilizan enzimas, hormonas y otras vitaminas (en concreto la vitamina A).

Los metales como el mercurio, plomo o cadmio son altamente tóxicos para aquellos órganos que los biotransforman o eliminan, como son el hígado y el riñón que están expuestos a un elevado estrés oxidativo. La vitamina E controla la peroxidación lipídica provocada por estos metales y protege a dichos órganos de la toxicidad. Así pues, el  $\alpha$ -tocoferol actúa como un gran antioxidante lipofílico y supresor del daño oxidativo en las membranas biológicas, tejidos y lipoproteínas, mediante la eliminación de radicales libres <sup>15</sup>.

▪ Vitamina C

Es un potente antioxidante exógeno e hidrosoluble, con un elevado poder reductor ante un gran abanico de ROS y especies reactivas de nitrógeno en medios acuosos. Esta molécula engloba el ácido L-ascórbico, protagonista de la acción protectora de la vitamina.

Aunque no se conoce del todo bien el mecanismo antioxidante del ácido L-ascórbico, sí se sabe que la vitamina C inhibe la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) debido a su capacidad de secuestrar ROS y especies reactivas de nitrógeno, protegiendo a las LDL de su ataque. Así, ayudaría a prevenir enfermedades que cursan con un aumento del estrés oxidativo como en las enfermedades cardiovasculares.

A pesar de esta capacidad antioxidante, a una dosis y situaciones fisiológicas determinadas se ha comprobado que muestra un efecto prooxidante debido a su potente acción reductora (ya que es capaz de reducir  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  que en presencia de oxígeno pueden generar una situación de gran estrés oxidativo)<sup>15</sup>.

- Compuestos fenólicos

Los polifenoles (incluyendo ácidos fenólicos y flavonoides) son más eficaces que la vitamina C contra el estrés oxidativo a nivel tisular<sup>16</sup>. Este tipo de moléculas son unas de las más activas que se obtienen a partir de fuentes naturales y muestran una amplia variedad de propiedades que resultan beneficiosas para la salud. Entre ellas, se encuentra su poder citoprotector, antibacteriano, antiviral, anti-envejecimiento, antiinflamatorio, antialérgico, vasodilatador, antidepresivo y la mejora de los efectos cognitivos<sup>17,18</sup>. Además, son la clase más abundante de fitoquímicos antioxidantes<sup>13</sup>.

- Glutación

Es un tripéptido formado por ácido glutámico, glicina y cisteína que sirve como agente reductor en multitud de reacciones. De ahí su gran importancia biológica por la versatilidad para contrarrestar especies reactivas como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , xenobióticos o hidroperóxidos de lípidos. Además, es el principal antioxidante que encontramos en las células.

El glutatión se encuentra en estado reducido (GSH) en las células y su grupo tiol (SH) es el responsable de su función protectora. La abundante presencia de cisteína en la estructura del GSH lo hace esencial para la regulación de los enlaces disulfuros de las proteínas y la eliminación de electrófilos y oxidantes. De este modo, el grupo SH redox – activo es oxidado cuando GSH reduce moléculas diana. Todo ello es posible por su bajo potencial redox (indicativo de un ambiente que favorece las reacciones de reducción) y su alta concentración presente en las células<sup>19</sup>.

- Coenzima Q

Es un antioxidante endógeno que en su forma reducida (ubiquinol) es muy efectivo y abundante e inhibe la peroxidación lipídica. También se le conoce por su papel en la cadena transportadora de electrones, participando en la producción de ATP<sup>1</sup>. Es la quinina liposoluble encargada de transferir los electrones desde los complejos I y II al complejo III dentro de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>20</sup>.

La coenzima Q se oxida durante dicha peroxidación de lípidos pero se regenera en la cadena respiratoria de modo que se mantiene en un estado altamente reducido. Reduce radicales directamente y regenera vitamina E a partir del radical  $\alpha$ -tocoferoxilo. Así mismo, el ubiquinol protege a los fosfolípidos de membrana y las LDL de la peroxidación lipídica, además del daño oxidativo causado por los radicales libres a las proteínas de membrana y al ADN <sup>21</sup>.

- Superóxido dismutasa (SOD)

Las SODs son un grupo de metaloenzimas (proteínas con iones metálicos y actividad oxidoreductasa) que suponen la principal defensa frente a  $O_2^-$  y la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo. Representa un grupo de enzimas que catalizan la conversión de  $O_2^-$  para producir  $H_2O_2$ , sin requerir de la presencia de cofactores. Pero  $H_2O_2$  sigue siendo un compuesto con oxígeno reactivo, por lo que seguidamente es detoxificado por la CAT y la GPX.



Sin embargo, su tiempo de vida media de circulación en sangre es limitado, además de inactivarse por el producto de la misma reacción que cataliza ( $H_2O_2$ ) <sup>22</sup>.

- Catalasa (CAT)

CAT es una enzima antioxidante que se encuentra presente en todas las células, en particular en peroxisomas. Estas enzimas son estructuras celulares con un grupo hemo en su sitio activo que permite convertir el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, eliminando este radical <sup>22</sup>.



La reacción tiene lugar por un mecanismo de dos etapas en las que el  $H_2O_2$  reduce el hierro del grupo hemo. En la primera etapa el peróxido oxida al grupo hemo, y en la segunda otra molécula de  $H_2O_2$  es utilizada como reductor para poder regenerar la enzima y producir agua y oxígeno. Al igual que la SOD, no necesita cofactores para llevar a cabo su función <sup>23</sup>.

- Glutatión peroxidasa (GPX)

Este tipo de enzimas reducen varias peroxidasa a sus alcoholes correspondientes. De un modo similar a la CAT, la GPX también descompone el  $H_2O_2$ . Con la diferencia que CAT emplea otra

molécula de peróxido como donador en la reducción del mismo  $H_2O_2$ , mientras que la GPX utiliza como agente al glutatión reducido. Por esa razón requiere un continuo aporte de glutatión, ya que este reductor se oxida durante la reducción de  $H_2O_2$  e hidroperóxido<sup>22</sup>.

- Mieloperoxidasa (MPO)

Los neutrófilos activados contienen y secretan MPO, la cual utiliza  $H_2O_2$  para oxidar iones cloruro a ácido hipoclorhídrico (fuerte agente oxidante). El resultado son radicales ácido de hipoclorito, hipobromito y radical tirosilo. Éste último, produce la peroxidación lipídica en las LDL, además de originar la unión entre residuos de tirosina y oxígeno, lo cual da lugar a ditirosina oxidada. Por esta razón se encuentra elevada la 3 – clorotirosina en las LDL aisladas de la íntima de los vasos sanguíneos de aquellos pacientes que padecen aterosclerosis. Es decir que la 3 – clorotirosina sirve como marcador de la oxidación que lleva a cabo la enzima mieloperoxidasa<sup>24</sup>.

- Cofactores

Se conocen como cofactores a los iones o moléculas que se unen al lugar catalítico de una apoenzima de modo que la hace activa. Por ejemplo, el cobre es un cofactor esencial para algunas enzimas como la citocromo C oxidasa o la SOD. El hierro es esencial para la CAT aunque también es un prooxidante, si se encuentra en exceso, a través de la reacción de Fenton (el hierro contribuye a catalizar la conversión de  $H_2O_2$  en  $OH^-$ )<sup>20</sup>.

### 1.3. Estrés oxidativo durante el ejercicio

El ejercicio físico intenso está asociado con un gran incremento de la absorción de oxígeno para la correcta funcionalidad del cuerpo y, en particular, del músculo esquelético. La mayoría del oxígeno consumido es utilizado en la mitocondria para la metabolización de sustrato y la producción de ATP, de modo que el oxígeno es reducido a agua. Sin embargo, hay una pequeña fracción de oxígeno (entre el 2 y el 5%) que es convertido en intermediarios reactivos que salen de la cadena de transporte de oxígeno. La producción de estas ROS son el mecanismo subyacente de una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren durante el ejercicio y son indicativos de estrés oxidativo<sup>25</sup>.

A medida que aumenta la fosforilación oxidativa en respuesta al ejercicio, habrá un aumento concomitante de los radicales libres. Además, las catecolaminas que se liberan durante el ejercicio

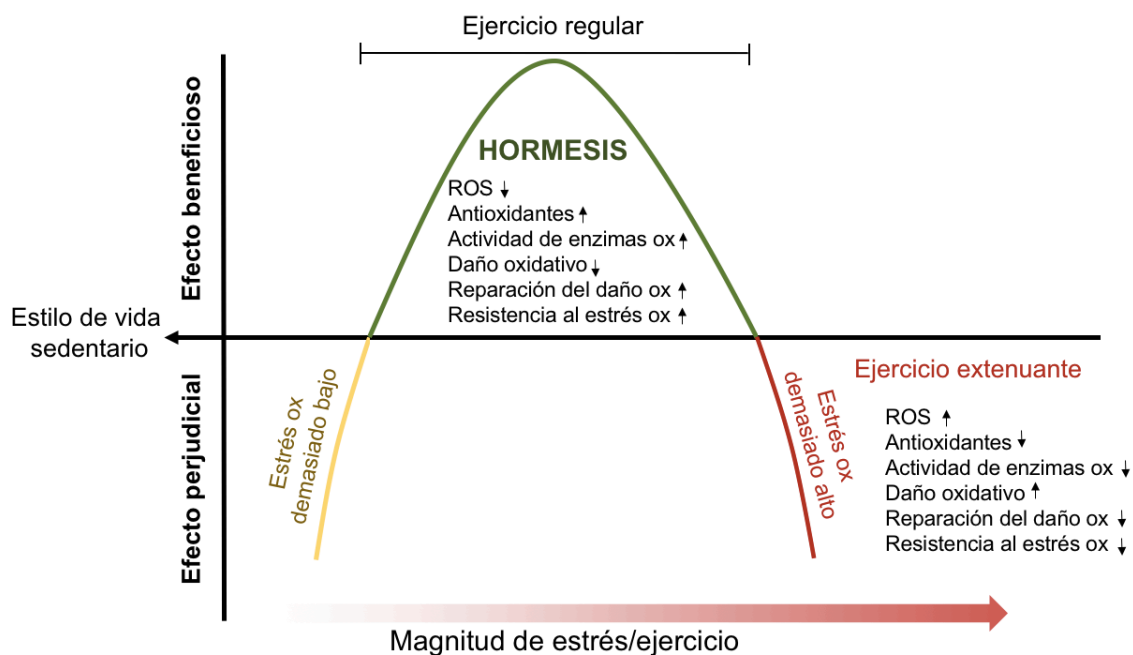
también pueden conducir a la producción de radicales durante su oxidación y son potencialmente citotóxicos<sup>5</sup>. Los productos de oxidación más comunes de las catecolaminas son el adrenocromo y los oxiradicales<sup>26, 27</sup>. El adrenocromo afecta a la membrana celular, en concreto a los canales catiónicos<sup>28</sup>, mientras que los oxiradicales agravan el estrés oxidativo en la célula, lo que provoca anomalías en la homeostasis del calcio<sup>28</sup>. Estas ROS intervienen en la pérdida progresiva de neuronas que ocurre durante enfermedades como el Parkinson o el proceso de envejecimiento<sup>29</sup>. Para contrarrestar el incremento de radicales, el cuerpo posee los compuestos antioxidantes anteriormente comentados. Sin embargo, cuando hay una producción excesiva de ROS (como ocurre durante ejercicio aeróbico prolongado o por deficiencia de antioxidantes por una nutrición pobre en estos compuestos) y una defensa inadecuada puede causar daño celular y tisular<sup>25</sup>.

Sin embargo, hay claras evidencias de que con el ejercicio regular, a pesar que los niveles de ROS se incrementen, también lo hace la actividad de algunas enzimas antioxidantes. Tanto las enzimas que previenen como las que reparan el daño celular muestran una actividad incrementada, lo cual consigue disminuir el daño celular producido por las ROS<sup>30, 31</sup>.

En un estudio dirigido por Rádak en el año 2000 en el cual se administraba H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ratas sedentarias y a ratas activas a intervalos de dos días, durante un periodo de dos semanas, se observaron evidencias de que la actividad física regular aumenta la resistencia al estrés oxidativo. Los resultados en animales sedentarios fueron de una mayor actividad del proteosoma (complejo que degrada proteínas dañadas o carboniladas) y una mayor concentración de proteínas carboniladas (proteínas marcadas con grupos carbonilos como los grupos aldehído o cetona, a causa de reacciones oxidativas, que sirven como indicador de estrés oxidativo y que serán degradadas por el proteosoma). En cambio, en ratas sometidas a un ejercicio regular, el mismo tratamiento no aumentó las proteínas oxidadas pero sí que elevó en gran medida la actividad del proteosoma<sup>32</sup>. Del mismo modo que se observa un efecto en las proteínas, se puede observar también en el ADN. Los datos de otro estudio sugieren que las ratas sometidas a ejercicio regular incrementan la actividad de la principal enzima reparadora del ADN en el músculo esquelético (OGG1; oxoguanina glicosilasa)<sup>33</sup>. Los niveles de la actividad de estas enzimas reparadoras del daño en la molécula de ácido nucleico puede ser la causa por la cual el ejercicio produce una disminución del daño celular<sup>34</sup>.

Por ello, el ejercicio es un excelente modelo en la dinámica del balance entre el desafío oxidativo y las defensas antioxidantes en los sistemas biológicos<sup>25</sup>.

Comprender los efectos del ejercicio en el balance redox es muy complejo y depende de diversos factores como son la edad, el sexo y la intensidad y duración del ejercicio. El ejercicio lleva a un incremento del estrés oxidativo, y éste es necesario para la correcta regulación de las defensas antioxidantes endógenas, así como para aumentar la resistencia al estrés. Esto aparece sugerido en la teoría de Hormesis (Fig. 3) en la que vemos como el ejercicio moderado y regular es beneficioso al disminuir la producción de ROS y aumentar la de los antioxidantes, pero no el ejercicio extenuante ya que éste puede conducir a la sobreproducción de ROS y la disminución de la cantidad y actividad de estos antioxidantes <sup>35</sup>.



**Fig. 3. Gráfica de la teoría de Hormesis.** El ejercicio regular reduce el estrés oxidativo, protege contra enfermedades y mejora la calidad de vida. El ejercicio extenuante incrementa el estrés oxidativo y el riesgo de padecer enfermedades. Sin embargo, un descenso excesivo del estrés oxidativo tampoco propicia beneficios para la salud. Gráfica adaptada a partir de la fuente bibliográfica <sup>35</sup>.

#### 1.4. Ejercicio, edad y estrés oxidativo

La capacidad para mantener el organismo en homeostasis va disminuyendo con la edad. Una de las razones es que el envejecimiento va asociado con una disminución de la actividad física, viéndose afectada la masa y la función de los músculos esqueléticos <sup>36</sup>. Aún así, numerosos estudios

demuestran que el ejercicio previene significativamente todos estos problemas asociados con el envejecimiento<sup>37, 38, 39</sup> incluyendo los cerebrales como es el Alzheimer<sup>40</sup>.

La actividad regular proporciona un mejor suministro de oxígeno y capilarización a diferentes regiones del cerebro, por lo que la actividad metabólica de las neuronas se ve aumentada y, consigo, su demanda de oxígeno. Este hecho va, probablemente, asociado con una mayor actividad de los antioxidantes y enzimas reparadoras del daño oxidativo<sup>41</sup>. Además de este incremento de actividad, también aumenta la producción de neutrófilos, los cuales permiten una mejora de la función cerebral y la supervivencia celular, además de una gran resistencia a varios factores que conducen a estrés oxidativo<sup>42</sup>.

En el hígado también se observan diferencias debidas al ejercicio regular. El incremento de ROS que conlleva el envejecimiento y el consecuente daño oxidativo en el tejido se ven atenuados con la práctica física regular<sup>43</sup>.

Así mismo, en cuanto al material genético también observamos cambios. El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) es uno de los factores de transcripción más potentes pero que es afectado por los procesos de envejecimiento. El ejercicio regular proporciona un efecto rejuvenecedor en el mismo<sup>43</sup>.

Por todos estos acontecimientos se puede confirmar que la actividad física moderada en personas mayores puede ralentizar los procesos asociados al envejecimiento, y consigo, disminuir la probabilidad de enfermedades asociadas con el mismo.

#### 1.5. Medición del estrés oxidativo

Para evaluar el estrés oxidativo en respuesta al ejercicio, básicamente se estudian marcadores de estrés en orina y sangre. Los productos de la peroxidación lipídica son los marcadores estudiados con más frecuencia en el daño oxidativo tisular durante el ejercicio aunque también se estudian mediante cambios en el estado de compuestos antioxidantes como el glutatión, productos de la oxidación de proteínas y ADN o actividad de enzimas antioxidantes<sup>5</sup>.

Para la medida de la peroxidación lipídica se utiliza pentano, malondialdehídos (MDA), hidroperóxidos de lípidos, isoprostanos y dienos conjugados. La mayoría de estudios se centran en el MDA como medida del estrés oxidativo provocado por el ejercicio. Esto es porque, cuando el ácido graso se descompone en la peroxidación lipídica, se generan aldehídos y gases de hidrocarburos

(etano y pentano). El MDA puede ser medido por HPLC o espectrofotometría<sup>44,45</sup>, aunque el método más común es el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBARS), a pesar de su baja especificidad. La especificidad de éste método es reducida debido a que el reactivo usado en el ensayo de TBARS reacciona a su vez con prostaglandinas, carbohidratos y aldehídos no funcionales<sup>46</sup>.

A lo largo de los años, ha habido diversidad de resultados en diferentes estudios centrados en la concentración de MDA en plasma. Tanto en un estudio del año 1997 de Marzatico como el de Santos – Silva en el 2001<sup>47,48</sup>, mostraron mayor concentración de MDA en plasma en atletas entrenados y nadadores adolescentes en relación a los sujetos control. En cambio, en 1996 Niess<sup>49</sup>, reportó que había una mayor concentración de MDA en plasma en sujetos no entrenados si los comparaba con los entrenados. Sin embargo, Miyazaki en el 2001<sup>50</sup> no observó cambios en sujetos entrenados o no entrenados. Por otro lado, se ha informado de un incremento en carbonilos proteicos en sangre tras el ejercicio aeróbico pero no en ejercicio isométrico<sup>46</sup>, además de un incremento de 8 – hidroxil – desoxiguanosina urinaria (8-OHdG<sup>51</sup>; demostrado válido como medida de oxidación de ADN<sup>45</sup>).

El GSH también se utiliza como medida de estrés oxidativo. La relación GSH/GSSG (glutatión oxidado en sangre) se ve disminuida en condiciones oxidantes<sup>52,53,54</sup>.

Otro método capaz de medir el poder antioxidante es FRAP (ferric reducing – antioxidant power), que permite medir la habilidad reductora del hierro en plasma y relacionarlo directamente con la capacidad de los antioxidantes presentes<sup>55</sup>.

En cuanto a las enzimas antioxidantes, los cambios de éstos en los eritrocitos también son útiles para documentar el estrés oxidativo. Las enzimas antioxidantes más comunes para esta medición son SOD, CAT, GPX y glutatión reductasa<sup>5</sup>. SOD constituye una de las principales defensas antioxidantes contra los radicales superóxido<sup>56</sup> por lo que su aumento de actividad corresponde con una mayor resistencia al estrés oxidativo<sup>57</sup>. En individuos entrenados, es más común encontrar altos niveles de actividad de SOD en sangre y músculo en reposo<sup>58,59</sup>. El parámetro de mayor importancia para la determinación del impacto de las enzimas antioxidantes es su actividad (ya que la expresión de su ARNm o cantidad de proteína enzimática no se traduce en un aumento de la actividad necesariamente)<sup>23</sup>.



## 2. Hipótesis y objetivos

### 2.1. Hipótesis

A pesar de que el ejercicio físico está asociado con un incremento del consumo de oxígeno debido a la mayor demanda energética, la práctica regular inducirá adaptaciones que permiten un descenso del estrés oxidativo. La hipótesis del presente trabajo es que el ejercicio físico regular tanto en hombres como en mujeres mayores inducirá adaptaciones que incrementarán la eficiencia del sistema antioxidante disminuyendo el daño oxidativo. La práctica de ejercicio regular aumenta la concentración de antioxidantes en relación a las personas sedentarias, mientras que disminuye la concentración de marcadores de oxidación y enzimas prooxidativas.

### 2.2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad antioxidante en plasma y el daño oxidativo de personas mayores de 55 años y relacionarla con la influencia de la actividad física regular. Para ello se realiza la determinación de la actividad catalítica de varias enzimas antioxidantes y prooxidativas, así como marcadores de daño oxidativo, de la capacidad antioxidante en plasma y antioxidantes exógenos. Los parámetros se miden tanto en hombres como en mujeres lo que permite realizar una comparación entre sexos y actividad.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Diseño experimental

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio sobre algunos marcadores de daño oxidativo, así como antioxidantes tanto endógenos como exógenos, en pacientes mayores de 55 años.

Para la selección de los sujetos de estudio, éstos debían cumplir con los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión. Los criterios de inclusión incluyen a personas mayores de 55 años de ambos sexos; los individuos varones presentan edades comprendidas entre 55 y 80 años, mientras que las mujeres de entre 60 y 80; y que consientan firmar el consentimiento informado para participar en el estudio. Ninguno de los individuos podía padecer obesidad o sobrepeso ( $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ ), patología cardiovascular documentada, diabetes tipo 2, tabaquismo (más de 1 cigarro al

día), hipertensión (igual o superior a 140/90 mm Hg) o hipercolesterolemia (LDL – colesterol >160 mg/dl o HDL – colesterol < 40 mg/dl). Además, debían ser capaces de cambiar sus hábitos alimenticios si fuese necesario (según religión, estado físico, etc.), no padecer alcoholemia ni infecciones (como VIH).

Se incluyeron un total de 72 sujetos que se dividieron en cuatro grupos de 18 individuos cada uno en función del género y si realizan o no actividad física, clasificándolos a través del cuestionario de actividad física de Minnessota<sup>60, 61</sup>.

Todos los participantes del presente estudio fueron informados debidamente antes de firmar el consentimiento informado para participar en el programa. Todo el procedimiento fue aprobado por el comité de ética de investigación clínica de las Islas Baleares y siguieron las guías regladas de la declaración de Helsinki.

En cuanto a los parámetros analizados se incluyeron los siguientes: CAT y SOD como enzimas antioxidantes, MPO como enzima prooxidativa, FRAP como indicador de la capacidad antioxidante endógena, polifenoles como antioxidantes exógenos y MDA como marcador de daño oxidativo.

Para medir la concentración/actividad de los parámetros se utilizó un espectrofotómetro y un lector de microplacas (Bio-Tek®, PowerWaveXS). A partir de los resultados obtenidos gracias a los espectrofotómetros y a través de rectas patrón o coeficientes de extinción molar se obtienen los datos representados en el apartado siguiente.

### 3.2. Determinación de MDA

Para la cuantificación de la concentración de MDA en plasma se utilizó un método colorimétrico que utiliza un reactivo diluido y una solución de MDA. El reactivo (R1) diluido se creó a partir de 1-metil-2-fenilindol y acetonitrilo. La dilución de R1 es 1 volumen de metanol en 3 volúmenes de R1 (3:1). Para crear el patrón utilizamos la solución de MDA, partiendo de Solución Standard de MDA (SSMDA) 4,17 M hasta conseguir SSMDA 2mM. A partir de éste último y con diluciones seriadas se obtienen las diferentes concentraciones: 0, 4, 8, 12, 16 y 20 nM de SSMDA. La absorbancia se realizó a 585nm, tras la adición de R1 y HCl 12N y una incubación de 1h a 45°C. Los datos se obtuvieron gracias al lector de microplacas.

### 3.3. Determinación de actividades enzimáticas

El parámetro más destacado para la determinación de la influencia de las enzimas es su actividad. Por ello, las lecturas proporcionan la actividad de las siguientes proteínas y se representan con la unidad Katal.

- Catalasa

La actividad de la catalasa se determinó a partir de un método basado en la descomposición de  $H_2O_2$ <sup>62</sup>. Los reactivos utilizados fueron el tampón fosfato 50 mM, pH 7 y  $H_2O_2$  30 mM. La lectura espectrofotométrica se llevó a cabo a 240 nm y en cubetas de cuarzo (ya que a dicha longitud de onda el plástico interfiere)

- Superóxido dismutasa

Para poder realizar la determinación de la actividad enzimática de SOD se ha de tener en cuenta el hecho de que la xantina oxidasa genera el anión superóxido que reduce al citocromo C. A través de un tampón fosfato potásico 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,8 y disolución citocromo C, dilución xantina en NaOH 0,01M y xantina oxidasa se pudo determinar el grado de inhibición de la reducción del citocromo C por este anión<sup>63</sup>. La absorbancia se midió a 550nm.

- Mieloperoxidasa

Se determinó la actividad de esta enzima gracias a un método de espectrofotometría continua y a partir de tampón fosfato 20 mM, pH 7, guaiacol 13,6 mM y  $H_2O_2$  300  $\mu$ M. La lectura se efectuó a 470 nm. Los resultados se pueden interpretar gracias al coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) 5,58  $mM^{-1} cm^{-1}$ .

### 3.4. Determinación de polifenoles

Para la determinación de los polifenoles se utilizó un método colorimétrico que utiliza el reactivo de Folin y carbonato sódico. Las muestras se desproteinizaron previamente a través de una solución de acetona a fin de evitar interferencias con el reactivo. El patrón utilizado parte de una dilución madre de Tgr en  $H_2O_2$  y carbonato sódico al 20 %, obteniendo 7 concentraciones diferentes con diluciones seriadas: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,075 y 0 mg/mL. Se incubaron las muestras durante 1,5 horas a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 760 nm.

### 3.5. Determinación de la capacidad antioxidante (FRAP)

*Ferric reducing – antioxidant power* (FRAP) permite medir el poder antioxidante. Mide la habilidad reductora del hierro en plasma. El complejo férrico de tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$  – TPTZ) se reduce al equivalente complejo de  $\text{Fe}^{2+}$  (hierro ferroso), en condiciones de pH bajo <sup>64</sup>. Cuando esto ocurre, se da una máxima absorbancia perceptible a 593 nm <sup>65, 66</sup>. Esta absorbancia está directamente relacionada con la capacidad de los antioxidantes (por su capacidad donadora de electrones) presentes en la muestra <sup>55</sup>.

Se utilizó la solución TPTZ 10 mM a partir de TPTZ puro en HCl 40 mM, cloruro férrico 20 mM y tampón acetato, pH 3,6. El patrón se obtuvo de la solución de Trolox (análogo de la vitamina E) de 10 mM en etanol, y con 6 diluciones seriadas. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 593 nm.

Para el cálculo de la capacidad antioxidante a partir de la recta patrón se expresó el resultado en equivalentes trolox (TEAC).

### 3.6. Análisis estadístico

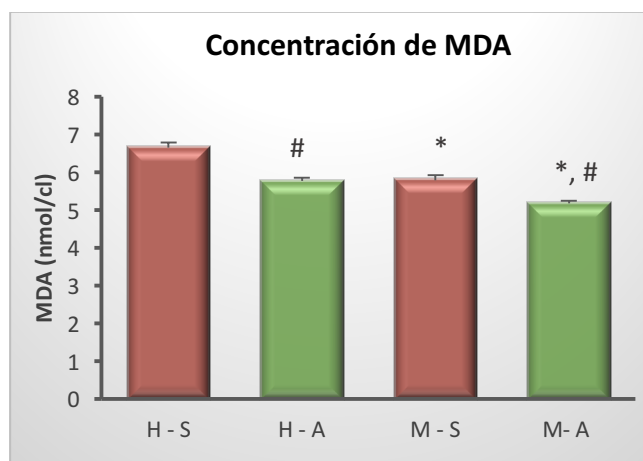
El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS v.21 para Windows. Para comparar los cuatro grupos de estudio se aplicó una ANOVA (analysis of variance) de dos factores (actividad física y sexo). En el caso de que existieran diferencias significativas, se utilizó una ANOVA de un factor utilizando como prueba post hoc el LSD (Fisher's least significant difference). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM (representado en las barras de error). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

Todos los resultados fueron determinados a partir de muestras de plasma de pacientes seleccionados rigurosamente. Los diferentes parámetros se midieron en todos los casos en ambos géneros y en las dos diferentes situaciones de actividad física (activos y sedentarios).

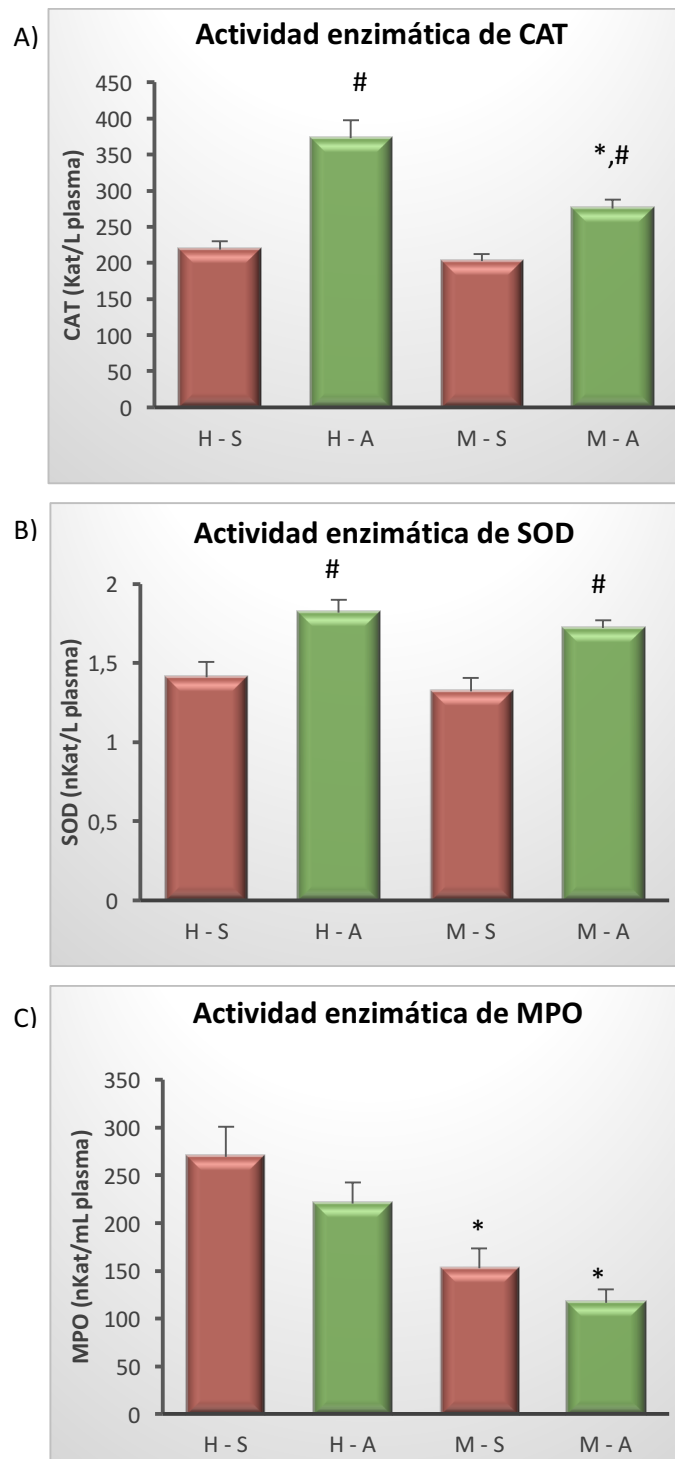
Los resultados de MDA se pueden observar en la Fig. 4. Se aprecia una menor concentración en los sujetos activos en relación a los sedentarios tanto en hombres como en mujeres. Hay diferencias

estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en cuanto a la actividad de ambos géneros: hombres sedentarios (H – S) en relación a hombres activos (H – A), y mujeres sedentarias (M – S) en relación a mujeres activas (M – A). A su vez, hay diferencias significativas en cuanto al sexo si se comparan con la misma actividad física respectivamente (hombres sedentarios con mujeres sedentarias, y hombres activos en relación a mujeres activas).



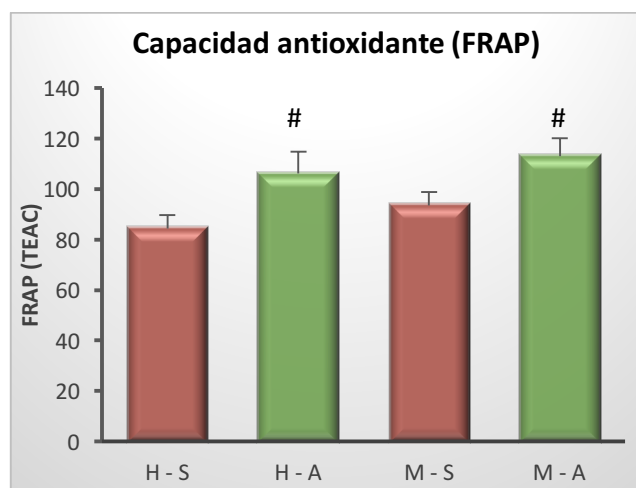
**Fig. 4. Concentración de MDA en plasma.** Valores expresados en nmol de MDA por cl de plasma. H – S: Hombres sedentarios; H – A: Hombres activos; M – S: Mujeres sedentarias; M – A: Mujeres activas. \* $p < 0,05$  cuando se compara en relación al sexo. #  $p < 0,05$  cuando se compara en relación a la actividad. Las barras de error representan medias  $\pm$  SEM.

Las actividades enzimáticas se muestran en la Fig.5: CAT (Fig. 5 A), SOD (Fig. 5 B) y MPO (Fig. 5 C). Hay una mayor actividad enzimática en aquellos sujetos que realizan actividad regular en los casos de CAT y SOD tanto en hombres como en mujeres. En el caso de MPO, la actividad mayor se observa en aquellos que no realizan ejercicio físico. Para CAT, en ambos géneros existen diferencias significativas para la actividad (H – S versus H – A y M – S versus M – A). En relación a las diferencias según el sexo solo es significativo el resultado de sujetos con actividad regular, es decir, H – A con respecto a M – A. En cambio, no es significativa la diferencia entre H – S y M – S. En SOD la actividad de hombres activos aumenta significativamente en relación a los hombres sedentarios, del mismo modo que ocurre en el caso de las mujeres; sin embargo no varían significativamente de un sexo a otro. Por último, aunque MPO muestra una tendencia a disminuir en aquellos individuos activos físicamente, presenta diferencias significativas con respecto al sexo pero no con respecto a la actividad. Por lo que disminuye la actividad significativamente de H – S a M – S y de H – A a M – A, pero no con respecto a la actividad dentro de un mismo género.



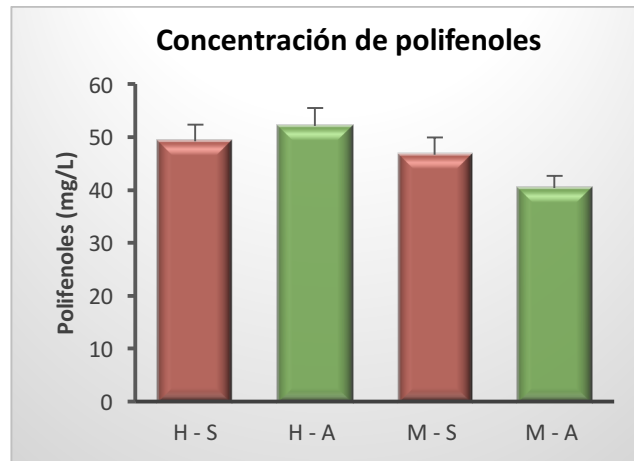
**Fig. 5. Actividad enzimática de CAT (A), SOD (B) y MPO (C) en plasma.** Valores expresados en kat/L, nKat/L y nKat/mL respectivamente. H – S: Hombres sedentarios; H – A: Hombres activos; M – S: Mujeres sedentarias; M – A: Mujeres activas. \* $p < 0,05$  cuando se compara en relación al sexo. #  $p < 0,05$  cuando se compara en relación a la actividad. Las barras de error representan medias  $\pm$  SEM.

Hay un aumento de FRAP (Fig. 6) en sujetos activos físicamente. Los resultados de sujetos activos son significativamente más elevados que los de sujetos sedentarios tanto en hombres como en mujeres (diferencias significativas con respecto a la actividad; H – S versus H – A, M – S versus M – A). En cambio, no hay diferencias significativas en cuanto al sexo.



**Fig. 6. Capacidad antioxidante (FRAP).** Valores expresados en equivalentes de trolox (TEAC). H – S: Hombres sedentarios; H – A: Hombres activos; M – S: Mujeres sedentarias; M – A: Mujeres activas. #  $p < 0,05$  cuando se compara en relación a la actividad. Las barras de error representan medias  $\pm$  SEM.

En la Fig. 7 se puede apreciar el último parámetro valorado en el estudio: polifenoles en plasma. A pesar de observarse una concentración ligeramente más elevada en varones activos que inactivos, la diferencia no es estadísticamente significativa. En cambio, en el caso de las mujeres, hay una mayor concentración de polifenoles entre las que no realizan una actividad regular aunque tampoco se trate de una diferencia significativa. Por lo tanto, no hay diferencias significativas ni respecto al sexo ni a la actividad.



**Fig. 7. Concentración de polifenoles en plasma.** Valores expresados en mg/L. H – S: Hombres sedentarios; H – A: Hombres activos; M – S: Mujeres sedentarias; M – A: Mujeres activas. Las barras de error representan medias  $\pm$  SEM.

## 5. Discusión

Los resultados de la presente investigación respaldan la hipótesis de que los marcadores de daño oxidativo son más elevados en personas sedentarias, y que la capacidad antioxidante y concretamente las enzimas antioxidantes presentan mayor actividad en personas activas físicamente.

El malondialdehído (MDA) es utilizado como un marcador de daño oxidativo, ya que se trata de un producto de la peroxidación lipídica. En el presente trabajo, se aprecia como la actividad física regular disminuye dicho daño oxidativo tanto en hombres como en mujeres mayores. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos en los que analizaron los niveles de MDA en individuos no entrenados, atletas que realizaban una actividad aerobia y atletas que realizaban una actividad anaerobia. En dicho estudio se describe que los niveles de MDA aumentaban significativamente en los individuos sedentarios con respecto a los valores obtenidos en los atletas, todos ellos de edades comprendidas entre 18 y 35 años<sup>67</sup>. Del mismo modo ocurre en el estudio de Roberta Ceci del año 2014, el cual se diferencia principalmente del anterior por presentar sujetos de edad avanzada (70 – 75 años). En el mismo se sometieron a 16 individuos a un entrenamiento de resistencia durante 12 semanas, en el cual apreciaron que la concentración de MDA en estos sujetos entrenados era menor que en los no entrenados. Con ello y otros parámetros analizados pudieron confirmar que un entrenamiento de resistencia induce a una adaptación celular que permite un envejecimiento más saludable<sup>68</sup>.



Las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) son enzimas antioxidantes endógenas que constituyen la primera y más eficaz línea de defensa contra las ROS. Los resultados de las actividades de dichas enzimas también fueron los esperados, siendo mayores en aquellos sujetos que realizaban actividad regular. Los resultados de SOD son equiparables a los del estudio de Siu, en el año 2011. Dicho estudio partía de la hipótesis que el ejercicio habitual supone un efecto protector para el ADN (evitando ser dañado) debido a la expresión elevada de antioxidantes y enzimas reparadoras de ADN. Para ello determinaron algunos marcadores, entre ellos la SOD. Observaron que la actividad de dicha enzima se encontraba incrementada en aquellos ratones que realizaron un ejercicio regular durante ocho semanas, con respecto a los control <sup>69</sup>. El estudio dirigido por Fraile y Bermúdez en el 2015 es muy similar al presente, ya que analizaron la relación de la actividad física regular y los marcadores de estrés oxidativo en plasma de personas mayores de 60 años (hombres y mujeres). Entre los parámetros analizados encontramos enzimas antioxidantes como la SOD, la actividad de la cual se encontraba aumentada en aquéllos que realizaban ejercicio regular, de modo que respaldan nuestros resultados <sup>70</sup>.

En cuanto a la CAT, en un estudio del año 2008 de los efectos del ejercicio físico sobre la actividad de dicha enzima en ratones mostraron un incremento de la enzima en los animales activos, tanto en plasma como en algunos tejidos como corazón e hígado <sup>71</sup>. Así mismo, en el estudio anteriormente nombrado de Fraile y Bermúdez también se determinó la actividad enzimática de la CAT en plasma. La actividad de ésta última presentaba un incremento en aquellos sujetos que realizaban ejercicio regular <sup>70</sup>, concordando con los resultados del presente trabajo.

La mieloperoxidasa (MPO), en cambio, es una enzima prooxidativa que indica el grado de activación de los neutrófilos. El ejercicio incrementa de manera aguda la actividad de los neutrófilos y, consigo, la concentración de MPO. Pero en este caso, la actividad de MPO ha sido medida en estado basal, no inmediatamente tras la actividad física. Los resultados revelan una menor actividad en los sujetos activos, debido a la adaptación que sufre el organismo frente a la actividad física regular. Esto concuerda con el estudio de Reyes y colaboradores del año 2014. Dicho estudio investigó los efectos de un entrenamiento de 12 semanas a diferentes intensidades en personas de edad avanzada (70 – 75 años). Entre todos los parámetros analizados encontramos MPO que presenta una actividad disminuida en los participantes activos en relación al grupo control <sup>72</sup>.

La capacidad antioxidante para reducir hierro o FRAP se utiliza como marcador del poder antioxidante. En el presente estudio, FRAP indicó un aumento de sus valores en las muestras de plasma analizadas de los sujetos activos físicamente. Esto demuestra que el ejercicio físico aumenta la capacidad antioxidante de las células. El estudio previo de Siu del que se ha hablado con

anterioridad respalda nuestros resultados. Con el fin de confirmar su hipótesis determinaron FRAP obteniendo resultados equiparables a los nuestros, ya que tras un entrenamiento regular de ocho semanas en un modelo murino, los valores de FRAP fueron significativamente mayor que en los ratones control<sup>69</sup>. Por otro lado, Turner publicó un artículo en Julio de 2011 en el que se investigaron si los cambios en la composición celular podían explicar las alteraciones producidas en los linfocitos tras el ejercicio regular en hombres de entre 33 y 44 años. Entre los parámetros determinados encontramos la capacidad antioxidante total medida a través de FRAP, apreciándose un aumento considerable en aquellos sujetos activos físicamente<sup>74</sup>.

En cuanto a la presencia de polifenoles en los sujetos de estudio, el presente trabajo evidencia que no están necesariamente ligados a la actividad física. El ejercicio no implica necesariamente una dieta más equilibrada (los polifenoles son enzimas antioxidantes exógenos). Los resultados no fueron estadísticamente significativos dando un mayor valor en hombres activos en relación a los sedentarios, y sin embargo, fue mayor en mujeres sedentarias que en activas. Por otro lado, una dieta suplementada con polifenoles sí que disminuye la producción de radicales libres según el estudio llevado a cabo por Kathryn en la universidad de Sudáfrica publicado en el año 2014. En cambio, la misma investigación pone en duda los efectos beneficiosos de los polifenoles para el ejercicio llevado a cabo por los atletas de élite de balonmano, básquet y voleibol<sup>74</sup>. Otra revisión también considera que la capacidad de los polifenoles para mejorar el ejercicio no está clara todavía y que requiere mayores investigaciones<sup>75</sup>.

En relación a las diferencias entre ambos sexos encontramos que en el caso de las mujeres el daño oxidativo (marcador MDA) es menor con respecto al de los hombres. Este menor daño lipídico en mujeres coincide con el menor grado de activación de neutrófilos y movilización. Esto es debido a que la masa muscular en hombres es mayor que en mujeres, por lo que requieren un consumo mayor de oxígeno que conlleva a producir más ROS. Esta mayor cantidad de ROS en hombres produce un mayor daño lipídico. Como consecuencia, la actividad de la enzima antioxidante CAT requiere ser mayor al haber más estrés oxidativo a combatir. Numerosos estudios han comprobado a lo largo del tiempo como los hombres tienen una mayor masa muscular que las mujeres. Uno de ellos es el de Janssen y colaboradores en el año 2000, en el que pudieron examinar la masa y la distribución de 468 hombres y mujeres de entre 18 y 88 años<sup>76</sup>. Adicionalmente, la investigación de Devries en este año 2016 demostró como, durante una actividad física, las mujeres precisan de un menor consumo de oxígeno que los hombres, indicando una menor oxidación para apoyar las necesidades energéticas durante el ejercicio<sup>77</sup>. El estudio llevado a cabo por Fraile y Bermúdez respalda algunos resultados del presente trabajo. Examinaron varios parámetros de estrés oxidativo

(incluyendo la enzima CAT) y observaron que los resultados más significativos entre la actividad física y los enzimas antioxidantes aparecieron en mujeres y no en hombres<sup>70</sup>. Del mismo modo, en un estudio llevado a cabo por Takahashi en el año 2013, pudieron observar que las concentraciones de peroxidación lipídica medida como TBARS (de sus siglas en inglés Thiobarbituric acid reactive substances) disminuían con la actividad física en mujeres. No se observó ésta correlación en hombres<sup>78</sup>. El hecho de que los resultados en éstos dos últimos estudios no hayan sido significativos en hombres no significa que la actividad física no produzca cambios en los mismos, pero sí indica que la influencia es menor que en el caso de las mujeres.

## 6. Conclusiones

El sistema antioxidante posee una gran capacidad de adaptación frente a la mayor producción de especies reactivas producidas durante el ejercicio. De hecho, la capacidad antioxidante en plasma de personas mayores se ha visto influenciada por la actividad física regular. Con la práctica de ejercicio regular se observó un descenso del grado de estrés oxidativo que se ha evidenciado con una disminución en los niveles de MDA, como indicador del daño oxidativo; y un aumento en las defensas antioxidantes endógenas para poder hacer frente de forma más eficaz a nuevas situaciones de estrés asociadas al ejercicio. En cambio, la actividad de la MPO (enzima con acción prooxidativa) presenta una actividad disminuida en aquellas personas que realizan actividad física regular. Adicionalmente, se puede concluir que los componentes exógenos con acción antioxidante no dependen de la actividad física realizada al no observarse cambios significativos en los niveles plasmáticos de polifenoles. Sería interesante determinar si los niveles plasmáticos de polifenoles se correlacionan con la ingesta de los mismos. Finalmente, los sujetos de sexo femenino en relación a los sujetos de sexo masculino presentan una ligera tendencia a una mayor capacidad antioxidante, así como una menor actividad de enzimas prooxidativas y menor daño oxidativo.

## 7. Referencias

1. Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. 2007.
2. Jack H. Wilmore DLC. *Fisiología Del Esfuerzo Y Del Deporte*. 6th ed.; 2007.
3. Mougios V. *Exercise Biochemistry*; 2006
4. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 1995;61:1-31.
5. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress , exercise , and antioxidant supplementation. 2003;189.
6. Heinonen, O.P., Albanes, D. and the members of the Alpha-Tocopherol B-CCPSG. The effect of vitamine E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancer in male smokers. *N Engl J Med*. 1994;330(15):1029-1035.
7. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. 1993;90(September):7915-7922.
8. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum JL. Modifications of low-density lipoproteins. *N Engl J Med*. 1989;320:915-924.
9. Situnayake RD, Thurnham DI, Kootatthep S, et al. Chain breaking antioxidant status in rheumatoid arthritis : clinical and laboratory correlates. *Ann ofthe Rheum Dis*. 1991;50:81-86.
10. Lang AE, Frpc C, Blair RDG, Frpc C. Parkinson ' s disease in 1984 : an update. *Can med assoc j*. 1984;131:1031-1037.
11. K. Hensley, J. M. Carney, M. P. Mattson, M. Aksenova, M. Harrus, J. F. Wu, R. A. Floyd Adab. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide : Relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(April):3270-3274.
12. Mirunalini VV and S. Assessment of Antioxidant Potential and Acute Toxicity Studies of Whole Plant Extract of Pergularia Daemia (Forsk). *Toxicol Int*. 22(1):54-60.
13. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants — Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*. 3(4):228-237.
14. Bonner MY, Arbiser JL. The antioxidant paradox: what are antioxidants and how should they be used in a therapeutic context for cancer. *Futur Med Chem*. 6(12):1413-1422.
15. Takhshid MA. Protective Effect of Vitamins E and C on Endosulfan-Induced Reproductive Toxicity in Male Rats. 2012;37(3).
16. Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent* 2009; 37:413-23.
17. Bouayed J. Polyphenols: a potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Curr Nutr Food Sci* 2010; 6:13-8.

18. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2:270-8.
19. Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(11).
20. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. 2007;2(2):219-236.
21. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1660:171-199.
22. Botello A V., Rendón von Osten J, Bouchot GG, Agraz-Hernández C. *Golfo de México: Contaminación E Impacto Ambiental : Diagnóstico Y Tendencias.*; 2005.
23. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*. 2010;5(1):51-66.
24. Aranceta J, Foz M, Gil B, et al. *Dieta Y Riesgo Cardiovascular.*; 2007.
25. During S. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Pergamon*. 1995;18(6):1079-1086.
26. Singal P.K., Beamish R.E., Dhalla N.S. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease, in: Spitzer J.J. (Ed.), *Advances in experimental medical biology*, Vol. 161, Plenum Publishing Corporation, New York, 1983, pp. 391–401.
27. Green D.E., Ritter D. Adrenaline and adrenochrome. *Biochem. J.* (1937) 31 596–616.
28. Adameova A., Abdellatif Y., Dhalla N.S. Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (2009) 87 493–514.
29. Adams, J. D.; Odunze, I. N. Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 10:161-169; 1991.
30. Crawford DR, Davies KJA. Adaptive Response and Oxidative Stress. *Env Heal Perspect*. 1994;102(10):25-28.
31. Avenue Z. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. *J Free Radic Biol Med*. 1986;2:155-173.
32. Rada Z. Exercise Preconditioning against Hydrogen Peroxide- Induced Oxidative Damage in Proteins of Rat Myocardium. 2000;376(2):248-251.
33. Apor P, Pucsok J, Berkes I, Ogonovszky H. Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. 2003;72:1627-1633.
34. Radák Z, Naito H, Kaneko T, et al. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Eur J Physiol*. 2002;(445):273-278.

35. D APM, Pace G, Lima P, et al. Exercise and oxidative stress : Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 2015;31(7-8):916-922.
36. Faulkner JA (1994) Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 26, 432–439.
37. Roos, M.R., Rice, C.L., Vandervoort A. Age-related changes in motor unit function. *Muscle Nerve*. 1997;20:679-690.
38. Durrant JR, Seals DR, Connell ML, et al. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice : direct evidence for reduced oxidative stress , increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. 2009;13:3271-3285.
39. Black MA, Green DJ, Cable NT. Exercise prevents age-related decline in nitric-oxide- mediated vasodilator function in cutaneous microvessels. 2008;14:3511-3524.
40. Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. 2005;(25):237-260.
41. Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsock J. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int*. 2001;38:17-23.
42. Mattson MP, Maudsley S, Martin B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease : insulin / IGF-1 , BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev*. 2004;3:445-464.
43. Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim H, Goto S. Age-associated increases in oxidative stress and nuclear transcription factor  $\kappa$  B activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J*. 2004.
44. Halliwell, B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5):715S/724.
45. Han, D., Loukianoff, S., McLaughlin, L.. In: Hanninen, O., Packer, L., Sen CK (Eds. . *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier, Amsterdam; 2000.
46. Alessio, H.M. In: Hanninen, O., Packer, L., Sen CK (Eds. . *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier, Amsterdam; 2000.
47. Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L., Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sport Med Phys Fit*. 1997;(37):235/239.
48. Santos-silva A, Irene M, Molnar E, et al. Leukocyte activation , erythrocyte damage , lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. 2001:119-126.
49. Niess AM, Hartmann A, Speit PC. DNA Damage After Exhaustive Treadmill Running in Trained and Untrained Men. *Int J Sport Med*. 1996;17(6):397-403.

50. Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., Haga, S., Ji, L.L., Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2001;84(1/2):1/6.
51. Okamura, K., Doi, T., Koichiro, H., Sakurai, M., Yoshioka, Y., Mitsuzono, R., Migita, T., Sumida, S. S. Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine excretion in humans. *Free Rad Res.* 1997;(26):507/514.
52. Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hänninen O, Sen CK. Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. 1999;4(1/2):7-9.
53. Sastre J, Ferrero JOA, Fisiologia D, et al. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood : prevention by antioxidant administration. 1992:992-995.
54. Sen CK. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Kluwer Acad Publ.* 1999;(196):31-42.
55. Matesanz ÁS. Capacidad antioxidante, medida por el método FRAP, de los aceites más consumidos en España. 2012;4(10):5003.
56. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals : focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 1999;(58):1025-1033.
57. Fielding RA, Meydani M. Exercise, free radical generation, and aging. *Aging Clin Exp Res.* 1997;9(1):12-18.
58. Izirtenblad N, Djurhuus S. Antioxidant status and lipid peroxidation maximal exercise in trained and untrained after short-term humans. *Am Physiol Soc.* 1997;(97):0363-6119.
59. Brites FD, Evelson PA, Garci M, et al. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci.* 1999;(96):381-385.
60. Elosua R, Marrugat J, Molina L, et al. TMI. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. *Am J Epidemiol.* 1994;139:1197-1209.
61. Elosua R, García M, Aguilar A, et al. I of the MG. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish women. *Med Sci Sport Exerc.* 2000;32:1431-1437.
62. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzym.* 1984;(105):121e126.
63. Flohe, L., Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzym.* 1984;(105):93e104.
64. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma ( FRAP ) as a Measure of ““ Antioxidant Power ””: The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996;(239):70-76.
65. Benzie IFF. *Clin. Biochem.*; 1996.
66. Liu, T. Z., Chin, N., Kiser, M. D., and Bigler WN. *Clin. Chem.*; 1982.
67. Park S, Kwak Y. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. 2016;12(2):113-118.

68. Ceci R, Reyes M, Valls B, et al. Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older adults following explosive-type resistance training. *Redox Biol.* 2014;2:65-72.
69. Siu PM, Pei XM, Teng BT, Benzie IF, Ying M, Wong SH. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. 2011:889-906.
70. Fraile-bermúdez AB, Kortajarena M, Zarrazquin I, Maquibar A, Yanguas JJ. Relationship between physical activity and markers of oxidative stress in independent community-living elderly individuals. *EXG.* 2015;70:26-31.
71. International CB. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. 2016;(January 2000).
72. Reyes M, Valls B, Dimauro I, et al. Explosive type of moderate-resistance training induces functional , cardiovascular , and molecular adaptations in the elderly. 2014:759-772.
73. Turner JE, Bosch JA, Drayson MT, Aldred S. Assessment of oxidative stress in lymphocytes with exercise. 2011:206-211.
74. Myburgh KH. Polyphenol Supplementation: Benefits for Exercise Performance or Oxidative Stress? 2014;44.
75. Malaguti M, Angeloni C, Hrelia S. Polyphenols in Exercise Performance and Prevention of Exercise-Induced Muscle Damage. 2013;2013.
76. Janssen IAN, Heymsfield SB, Wang ZIM, Ross R, Heymsfield SB, Wang Z. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18 – 88 yr. 2000:81-88.
77. MC D. Sex-based differences in endurance exercise muscle metabolism: impact on exercise and nutritional strategies to optimize health and performance in women. *Exp Physiol.* 1(101 (2)):243-249.
78. Takahashi, M. Miyashita, M. Kawanishi, N. Park, J.H. Hayashida, H. Kim H. The association between physical activity and sex-specific oxidative stress in older adults. *Eur J Appl Physiol.* 2013;12(3):571-578.