



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA MELATONINA EN  
EL MÚSCULO CARDÍACO DE RATAS SOMETIDAS A  
EJERCICIO FÍSICO AGUDO**

**CHRISTIANO EDUARDO VENEROSO**

**LEÓN 2010**





Universidad de León

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y  
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día        de        de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "Efecto antiinflamatorio de la melatonina en el músculo cardíaco de ratas sometidas a ejercicio físico agudo", dirigida por los Dres. Dña. Pilar Sánchez Collado y D. Javier González-Gallego y elaborada por D. Christiano Eduardo Veneroso.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 8º 2 del R.D. 778/98, en León a        de        de 2010.

VºBº Directora Dpto.

La Secretaria Dpto.

Fdo. Dra. Mª Jesús Tuñón González Fdo. Dra. Mª Nélida Fernández Martínez





Universidad de León

**INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Dres. Dña. Pilar Sánchez Collado y D. Javier González-Gallego como directores de la Tesis Doctoral titulada "Efecto antiinflamatorio de la melatonina en el músculo cardíaco de ratas sometidas a ejercicio físico agudo" realizada por D. Christiano Eduardo Veneroso en el Departamento de Ciencias Biomédicas, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005,  
en León a            de            de 2010

Fdo. Dra. Pilar Sánchez Collado

Fdo. Dr. Javier González-Gallego



## *Agradecimientos*

*El tiempo que he pasado realizando esta tesis me ha servido para crecer como investigador, pero más como persona, es por ello, que quiero agradecer a toda la gente que ha pasado por esta etapa tan importante de mi vida. No os olvidaré nunca.*

*Primero quisiera manifestar mi más profundo agradecimiento a mis Directores de Tesis, Javier y Pilar sus conocimientos, preocupación y permanente apoyo recibido para la elaboración de esta Tesis Doctoral. Quiero manifestarles a ustedes señores directores, vuestros consejos y vuestras enseñanzas guiarán siempre mi vida profesional y, en lo personal, aún a la distancia, serán siempre recordados con un sentimiento de gratitud y también de mucha nostalgia.*

*A los profesores María Jesús, José Luís, Sonia, María José, Paquita, Ana, Mar, Victoria, Juan Pablo e Idelfonso por su predisposición permanente para brindarme ayuda en todo momento, así como por compartir conmigo generosamente su experiencia y valores vitales. De todo corazón, muchas gracias.*

*No me puedo olvidar de mis compañeros de departamento y de Inbiomed: Héctor, Ludivina, Elena, Irene, Gracia, Beatriz, Susana, María Jesús, Javi, Rodrigo, por haberme demostrado siempre su cariño y haberme ayudado siempre que os necesito.*

*A todos mis amigos españoles David y María, brasileños Guilherme Pussieldi, Guilherme Bresciane, Eduardo Pimenta, Paulinho Mendonça, Paulo Terror, Márcio Nijimba por haberme demostrado siempre su cariño y haberme ayudado siempre que os necesito, así como por aguantarme tanto en los buenos como en los malos momentos. Con todos ellos he compartido inolvidables momentos.*

*Pero todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi madre Julia, mis abuelos Terezinha y Victorio y especialmente de mi mujer Ana Flávia, por haberme inculcado unos valores basados en el respeto, amor, trabajo y constancia, tan necesarios para cualquier aspecto de la vida. Gracias por darme tanto ánimo y comprensión en todo momento, gracias por ser así. No puedo olvidarme de mis suegros Preto y Christina, mis cuñados Alysson y Mariana y de todos aquellos que de alguna que aunque ya no están aquí, sé que me cuidan y ayudan en todo momento y seguro que estarían orgullosos de mí, al igual que yo de ellos.*

*Al resto de miembros del Departamento de Fisiología por su comprensión y por su amistad.*

*Gracias a todos.*



*A mi familia y amigos*



Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido incluidos en la siguiente publicación y comunicación a congreso:

Veneroso C., Tuñón M.J., González-Gallego J., Collado P.S. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. **Journal of Pineal Research** Sep; 47(2):184-91, 2009.

Veneroso C.E., Collado P.S., González-Gallego J. Effect of melatonin on the proinflammatory responses in heart muscle rats after physical exercise. **XXXV Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences**. Valencia, 17th-20th February 2009.



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
CAM	Moléculas de adhesión
COX	Ciclooxigenasa
DTT	Ditiotreitol
E.E.M	Error estándar de la media
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Consumo energético
g	Gramo
GLP	<i>Good Laboratory Practices</i>
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
ml	Mililitros
ml/Kg/min	Mililitros/kilo/minuto
mM	miliMols
mg	Miligramos
mg/Kg	Miligramos/kilogramos
M	Molar
m/min	Metros/minuto
ng/ml	Nanogramos/mililitros
NK	Natural killers
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Peso/volumen
PBS	Tampón fosfato salino
r.p.m	Revoluciones por minuto
RQ	Cociente respiratorio
<i>RT-PCR</i>	Retrotranscripción reacción en cadena de la polimerasa
UV	Ultravioleta
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VO <sub>2</sub> máx	Volumen máximo de oxígeno

---



<b>INDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>pág.</b>
<b>1 INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
2.1 EJERCICIO Y FISIOLÓGÍA DEL MÚSCULO CARDÍACO.....	9
2.1.1 El ejercicio.....	9
2.1.2 Sustratos energéticos durante el ejercicio físico.....	11
2.1.3 Adaptaciones cardiovasculares al ejercicio.....	15
2.1.4 Ejercicio físico y factores de riesgo coronario.....	17
2.2 INFLAMACIÓN.....	23
2.2.1 Sistema inmune.....	23
2.2.2 Respuestas inflamatorias.....	24
2.2.2.1 Respuestas innatas.....	24
2.2.2.2 Respuestas adquiridas.....	25
2.2.2.3 Tipos de respuestas inmunes adquiridas.....	26
2.2.3 Mediadores inflamatorios.....	27
2.2.3.1 Mieloperoxidasa (MPO).....	28

2.2.3.2 Citoquinas.....	29
2.2.3.3 Óxido nítrico.....	34
2.2.3.4 Ciclooxygenasa (COX).....	39
2.2.3.5 Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1).....	41
2.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	43
2.3.1 Factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).....	44
2.3.2 Genes regulados por el NF- $\kappa$ B.....	46
2.4 INFLAMACIÓN E EJERCICIO.....	47
2.5 MELATONINA.....	51
2.5.1 Biosíntesis de la melatonina.....	52
2.5.2 Metabolismo de la melatonina.....	54
2.5.3 Propiedades antioxidantes de la melatonina.....	55
2.5.4 Melatonina e inflamación.....	58
<b>3 METODOLOGÍA.....</b>	<b>65</b>
3.1 ÁMBITO DEL TRABAJO.....	65
3.2 ANIMALES.....	65



3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	65
3.3.1 Grupos experimentales.....	67
3.4 MEDICIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	67
3.5 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO. RECOGIDA DE MUESTRAS.....	69
3.6 SOLUCIONES UTILIZADAS.....	69
3.7 APARATOS UTILIZADOS .....	70
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	72
3.8.1 Determinaciones en sangre.....	72
3.8.1.1 Obtención de plasma sanguíneo.....	72
3.8.1.2 Determinación de la creatín quinasa (CK) en plasma.....	72
3.8.1.3 Determinación de la creatín quinasa MB (CK-MB) en plasma.....	74
3.8.2 Determinaciones en músculo cardíaco.....	75
3.8.2.1 Obtención de homogeneizado fresco.....	75
3.8.2.2 Obtención de la fracción citosólica.....	76
3.8.2.3 Obtención de extractos nucleares.....	76

3.8.2.4 Concentración de proteínas.....	77
3.8.2.5 Actividad de la mieloperoxidasa (MPO).....	78
3.8.2.6 Cuantificación de las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$ , iNOS, ICAM-1 y COX-2 por <i>Western Blot</i> .....	80
3.8.2.7 Retrotranscripción-amplificación cuantitativa del ARN ( <i>RT-PCR</i> en tiempo real).....	84
3.8.2.8 Determinación del factor NF- $\kappa$ B.....	90
3.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	94
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
4.1 PESO CORPORAL Y PESO CARDÍACO EN LOS DISTINTOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	97
4.2 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE PARÁMETROS METABÓLICOS.....	98
4.3 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR: CREATÍN QUINASA TOTAL (CK), CREATÍN QUINASA CARDÍACA (CK-MB) Y MIELOPEROXIDASA (MPO).....	100

4.4 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LAS CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN EL MÚSCULO CARDÍACO.....	103
4.5 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE MARCADORES INFLAMATORIOS iNOS, COX-2 e ICAM-1 EN EL MÚSCULO CARDÍACO.....	105
4.6 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR DE TRANSCRIPCIÓN-κB (NF-κB) Y LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA RUTA DE ACTIVACIÓN: IκBα, IKKα EN EL MÚSCULO CARDÍACO.....	112
<b>5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>119</b>
5.1 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE PARÁMETROS METABÓLICOS.....	119
5.2 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR: CREATÍN QUINASA TOTAL (CK), CREATÍN QUINASA CARDÍACA (CK-MB) y MIELOPEROXIDASA (MPO).....	121
5.3 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LAS CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN EL MÚSCULO CARDÍACO.....	123

5.4 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE MARCADORES INFLAMATORIOS iNOS, COX-2 e ICAM-1 EN EL MÚSCULO CARDÍACO.....	125
5.5 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR DE TRANSCRIPCIÓN- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Y LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA RUTA DE ACTIVACIÓN: I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$ EN EL MÚSCULO CARDÍACO.....	129
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>143</b>

<b>ÍNDICE DE ESQUEMAS</b>	<b>pág.</b>
<b>Esquema 1</b> Metabolismo energético durante un ejercicio prolongado de intensidad moderada.....	14
<b>Esquema 2</b> Síntesis y funciones del óxido nítrico.....	38
<b>Esquema 3</b> Ruta de activación del NF- $\kappa$ B.....	45
<b>Esquema 4</b> Síntesis de melatonina en la glándula pineal.....	52
<b>Esquema 5</b> Funciones de la melatonina.....	58
<b>Esquema 6</b> El efecto antiinflamatorio de la melatonina.....	60
<b>Esquema 7</b> Esquema de la técnica del <i>Western-blot</i> .....	84
<b>Esquema 8</b> Representación de la amplificación en <i>RT-PCR</i> .....	85
<b>Esquema 9</b> Curva de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico.....	86



---

ÍNDICE DE FIGURAS	pág.
<b>Figura 1</b> Efectos del ejercicio y melatonina en el consumo de O <sub>2</sub> (mL/Kg/min).....	99
<b>Figura 2</b> Efectos del ejercicio y melatonina en la CK en plasma.....	102
<b>Figura 3</b> Efectos del ejercicio y melatonina en la CK-MB en plasma.....	102
<b>Figura 4</b> Efectos del ejercicio y melatonina en la actividad de la MPO en el músculo cardíaco.....	103
<b>Figura 5</b> Expresión relativa de ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 por <i>RT-PCR</i> .....	105
<b>Figura 6</b> (A) Expresión relativa de ARNm de iNOS por <i>RT-PCR</i> . (B) Expresión de proteína para la iNOS por <i>Western blot</i> músculo cardíaco.....	107
<b>Figura 7</b> (A) Expresión relativa de ARNm de la COX-2 por <i>RT-PCR</i> . (B) Expresión de proteína para la COX-2 por <i>Western blot</i> músculo cardíaco.....	109
<b>Figura 8</b> (A) Expresión relativa de ARNm de la ICAM-1 por <i>RT-PCR</i> . (B) Expresión de proteína para la ICAM-1 por <i>Western blot</i> en músculo cardíaco.....	111

**Figura 9** Activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B en extracto nuclear de músculo cardíaco en los diferentes grupos experimentales. (C-: control negativo; C+: control positivo).....114

**Figura 10** Expresión de proteína  $I\kappa B\alpha$  por *Western blot* en músculo cardíaco.....115

**Figura 11** Expresión de proteína  $IKK\alpha$  por *Western blot* en músculo cardíaco.....116



**ÍNDICE DE TABLAS**

**pág.**

**Tabla 1** Peso corporal y peso del músculo cardíaco en el día del experimento.....97

**Tabla 2** Consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> durante la carrera para los grupos de ejercicio sin melatonina y ejercicio con melatonina.....98

**Tabla 3** Cociente respiratorio y consumo energético durante la carrera para los grupos de ejercicio sin melatonina y ejercicio con melatonina.....100

**Tabla 4** Efectos del ejercicio y melatonina en la CK y CK-MB plasmática y la actividad de la MPO en el músculo cardíaco.....101



# **1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



## **1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

En la actualidad están totalmente admitidos los efectos cardiovasculares beneficiosos del ejercicio físico. Sin embargo no hay que olvidar el que también se considera que determinados ejercicios pueden estar directamente relacionados con la muerte súbita o infartos de miocardios en individuos especialmente sensibles. De menor gravedad se han descrito alteraciones miocárdicas ocasionales tras ejercicios prolongados e intensos con modificaciones en la función sistólica y diastólica.

Diversos estudios han demostrado que un incremento en las concentraciones de citoquinas como la IL-6 o el TNF- $\alpha$  puede provocar un daño en los miocitos y/o modular la funcionalidad cardíaca. Así mismo, estudios realizados en modelos animales de fallo cardíaco indican la presencia de un incremento en la peroxidación lipídica del tejido cardíaco y una expresión disminuida de las defensas antioxidantes. Al realizar ejercicio físico es posible que el músculo cardíaco presente un daño debido al estrés oxidativo.

Por otra parte está descrito que el citado estrés oxidativo se relaciona con la liberación de diferentes mediadores implicados en el proceso inflamatorio, situación presente tras ejercicio físico agudo, en el cual se pueden presentar incrementos en la concentración de marcadores de daño inflamatorio, incluyendo el TNF- $\alpha$  e IL-6. Al mismo tiempo no conviene olvidar que la biosíntesis de otros mediadores de la inflamación como las prostaglandinas y del óxido nítrico, mediante la ciclooxigenasa y la óxido

nitrico sintetasa inducible respectivamente, pueden incrementarse durante el ejercicio físico, hecho ya descrito en músculo esquelético.

La activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), sensible a los cambios redox intracelulares, puede contribuir al daño inflamatorio. El NF- $\kappa$ B induce un incremento coordinado de la expresión de genes proinflamatorios que incluyen citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), enzimas que generan mediadores de inflamación (COX-2, iNOS) y moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1).

La asociación entre el estrés oxidativo, la aparición de un proceso inflamatorio y el desarrollo de multitud de disfunciones ha hecho que muchos investigadores se centren en la búsqueda de sustancias que neutralicen los efectos desencadenados por los radicales libres.

La melatonina, hormona principal secretada por la glándula pineal y objeto de nuestro estudio, había sido considerada hasta hace unos años exclusivamente en su faceta como hormona implicada en la regulación de ritmos circadianos, procesos de sueño, etc. Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto el gran potencial de la melatonina como molécula antioxidante. Además, las peculiares características estructurales de esta hormona de la familia de los indoles, entre ellas su rápida y fácil difusión a través de todo tipo de membranas, su acción efectiva a bajas concentraciones y su inocuidad, han hecho de la melatonina un foco de creciente interés en la actualidad. El efecto de su administración exógena se ha analizado en diversos modelos de daño tisular incluyendo el

originado por el ejercicio físico en el músculo esquelético. La melatonina reduce el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica al inhibir la activación del NF- $\kappa$ B

Contemplando todo lo expuesto anteriormente, el presente trabajo se diseñó con el fin de establecer los posibles efectos de un protocolo de ejercicio agudo sobre diversos mediadores de la inflamación en el músculo cardíaco de animales sedentarios, así como establecer los posibles beneficios de la administración de melatonina. Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

1. Estudiar el efecto de un protocolo agudo de ejercicio sobre algunos marcadores de daño muscular (CK, CK-MB y MPO), la expresión de diferentes citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), mediadores del proceso inflamatorio (iNOS, COX-2) y moléculas de adhesión (ICAM-1) en el músculo cardíaco.
2. Investigar la acción de la melatonina sobre los cambios en la expresión de los diferentes marcadores de inflamación inducidos por el ejercicio agudo.
3. Analizar si el posible efecto antiinflamatorio beneficioso de la melatonina en tejido miocárdico está relacionado con una inhibición de la vía de señalización mediada por NF- $\kappa$ B.





**2 ANTECEDENTES**



## **2.1 EJERCICIO Y FISIOLÓGÍA DEL MÚSCULO CARDÍACO**

### **2.1.1 El ejercicio físico**

Según la Declaración del Consenso de la Federación Española de Medicina del Deporte (FEMEDE) en el año 2000, (Vuori y cols., 2000) manifiesta que..." los ciudadanos de la Unión Europea (UE) necesitan con urgencia ampliar su actividad física con el fin de mejorar su nivel actual de salud y sus capacidades funcionales y mantener éstas hasta una edad avanzada". Sin embargo, a pesar de la privilegiada situación de estabilidad política, productividad económica y bienestar social, que en conjunto han llevado a conseguir un alto nivel de salud pública, el estilo de vida derivado de la adquisición de nuevas tecnologías que promueven la tendencia al sedentarismo (maquinaria en fábricas y en el campo, uso de ordenadores, escaleras mecánicas) ha aumentado las patologías crónicas degenerativas, desencadenadas en gran parte por la disminución de la actividad física en la vida diaria.

Por otro lado, aunque los sistemas de asistencia sanitaria cuentan con los recursos terapéuticos tecnológicamente más avanzados para abordar la enfermedad en sus distintas manifestaciones, éstos no resultan suficientemente eficaces en la prevención de muchas de las enfermedades con mayor prevalencia en la actualidad en nuestro medio (enfermedad coronaria, hipertensión, obesidad, artrosis, osteoporosis).

Los beneficios de un ejercicio físico incluyen la mejora de manera significativa de una variedad de capacidades funcionales relacionadas con

el transporte y utilización de oxígeno (Hickson y cols., 1992). Las mitocondrias del músculo esquelético entrenado tienen una capacidad mucho mayor para generar el ATP aeróbicamente mediante la fosforilación oxidativa (Holloszy y Coyle, 1994). Igualmente, se observa un aumento tanto del número como del tamaño de las mitocondrias y una potencial duplicación del nivel de las enzimas del sistema aeróbico. Además, el contenido de mioglobina de los músculos esqueléticos en animales aumenta en 80% (Pattengale y Holloszy, 1987), y se observa un aumento en la capacidad de músculo entrenado para movilizar y oxidar las grasas (Donovan y Brooks, 1993) como también de oxidar los carbohidratos (Gollnick, 1983) determinando además, adaptaciones metabólicas en los diferentes tipos de fibras musculares (Thorstensson, 1992), y una hipertrofia selectiva de diferentes fibras musculares a causa de un entrenamiento específico de sobrecarga (Gollnick, 1983).

Sin embargo, esta respuesta adaptativa e intermediaria al esfuerzo va a depender del tipo de ejercicio, de su intensidad, de su duración y de su frecuencia, como también estará condicionada por la función del miocardio, el estado de vascularización periférica, la edad de los sujetos, el sexo y, por sobre todo, por su nivel de entrenamiento (Larsen y cols., 2001) Aunque existen diferencias por edad y género los datos acumulados indican que la mayoría de los efectos pueden observarse en los dos sexos y en una amplia gama de edades (Boghossian y Alliot, 2000).

Uno de estos beneficios es el incremento de la capacidad máxima de trabajo, expresado como consumo máximo de oxígeno ( $\text{VO}_2 \text{ max}$ )

(Scheuer, 1992), que se produce en función del incremento del gasto cardíaco máximo y del aumento de la diferencia arteriovenosa en la concentración de oxígeno (Froelicker, 1986).

La intensidad, la duración, y la frecuencia del ejercicio son importantes a la hora de dosificar el entrenamiento (Terramot, 1998), y así está demostrado que combinando adecuadamente estas variables pueden conseguirse mejoras cardiorrespiratorias por medio de un programa físico realizado a intensidades entre el 50% y el 85% del  $VO_2$  máx. con una frecuencia de dos a cinco veces por semana y una duración de 15 a 60 minutos. Actualmente, los estudios demuestran que las actividades de intensidad moderada generan beneficios considerables para la salud. La recomendación actual de una actividad física para la salud definida por organismos especializados consiste en la acumulación de 30 minutos o más de actividad física de intensidad moderada. Esta breve recomendación constituye un mensaje de salud para las personas sedentarias, y se basa en gran medida en la tradición y la prioridad concedida a los beneficios cardiovasculares de la actividad física.

Sin embargo, los efectos beneficiosos del ejercicio se anulan si conducen al deportista al agotamiento (Gomez-Cabrera y cols., 2008).

### **2.1.2 Sustratos energéticos durante el ejercicio físico**

Los diferentes sustratos energéticos disponibles se utilizan en una proporción que depende de la intensidad y duración del ejercicio, entre otros factores.

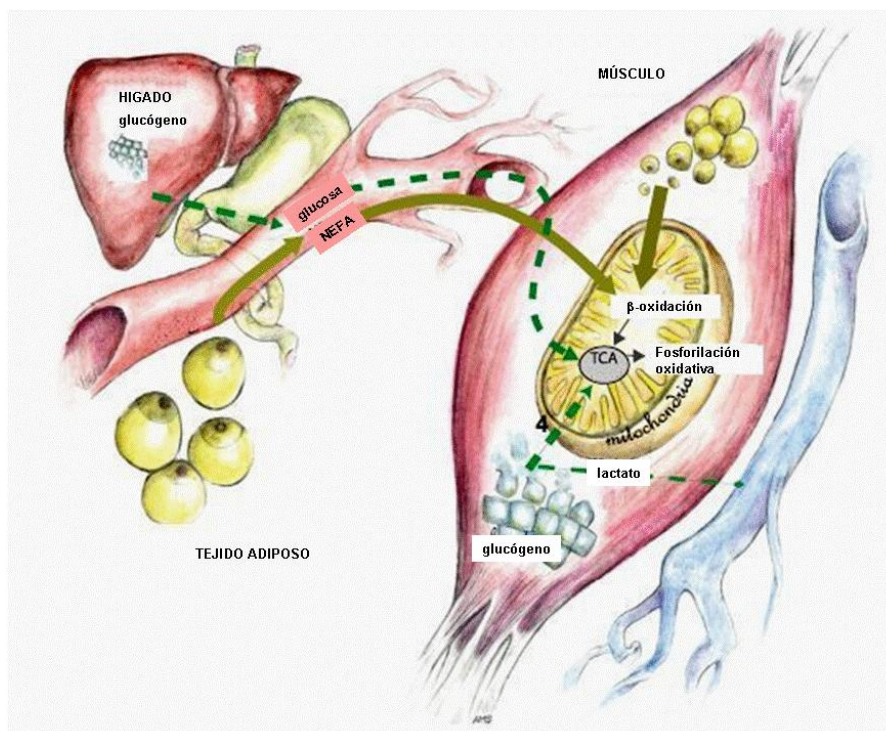
Para los esfuerzos cortos e intensos el organismo utiliza la glucosa contenida en las células musculares. Si la demanda de energía dura más de 30 segundos, la glucosa que transporta la sangre puede entrar en las células musculares y ser utilizada. A medida que la duración del esfuerzo aumenta, el glucógeno almacenado en las células musculares se transforma en glucosa y se utiliza como combustible (González-Gallego y cols., 2006).

Cuando este aporte de glucosa se hace insuficiente, el hígado, que almacena la mayor cantidad de glucógeno del organismo, hace una contribución de sus depósitos energéticos convirtiendo el glucógeno almacenado en glucosa, que es liberada en el torrente sanguíneo.

Este aumento de la contribución de los hidratos de carbono como sustrato energético, es más importante sobre todo, a intensidades de ejercicio superiores al 75% del consumo máximo de oxígeno. Si el hígado y los músculos están deplecionados de glucógeno por una dieta baja de carbohidratos, o por restricción calórica el agotamiento surge antes de tiempo. Cuando el esfuerzo va alcanzando los 30 minutos de duración, los ácidos grasos libres de la sangre toman más importancia como combustible energético; las catecolaminas liberadas durante el esfuerzo, actúan sobre los receptores beta de las células grasas y activan la lipasa que hidroliza a los triglicéridos, desdoblándolos en glicerol y ácidos grasos. Los ácidos grasos circulantes, llegan a las células musculares donde se metabolizan (ciclo de Krebs) para obtener energía; o bien se depositan en las células musculares en forma de triglicéridos. Hoy en día, se cree que

estos depósitos intramusculares de triglicéridos son un sustrato muy importante durante el ejercicio de resistencia. En esfuerzos prolongados (más de 2 horas), los carbohidratos ceden el puesto a las grasas como combustible dominante. Además, al aumentar la duración del ejercicio, aumenta también la contribución de las proteínas como combustible (González-Gallego y cols., 2006).

Durante muchos años se pensó que las proteínas no tenían un papel importante en el metabolismo energético durante el ejercicio físico; sin embargo, actualmente se sabe que algunos aminoácidos juegan un papel destacado. De hecho, se han realizado numerosos estudios, que basados en el aumento de la urea sanguínea y la excreción de nitrógeno, sugieren que las proteínas pueden ser degradadas durante el esfuerzo físico, representando entre el 3 y el 18% de la energía total generada. Sin embargo, la oxidación de los aminoácidos, desde el punto de vista energético, es poco importante en los ejercicios con una duración inferior a 60 minutos (González-Gallego y cols., 2006).



**Esquema 1.** Metabolismo energético durante un ejercicio prolongado de intensidad moderada. Fuente: Riddel, 2008.

El metabolismo de la glucosa y de las grasas depende de la disponibilidad de  $O_2$ , al tiempo que se produce  $CO_2$  y agua. El contenido de carbono y oxígeno en los distintos nutrientes (hidratos de carbono, grasas y proteínas) difiere sustancialmente, por lo que la proporción entre la cantidad de  $CO_2$  y  $O_2$  liberado y consumido en la respiración, denominada cociente respiratorio o intercambio respiratorio ( $Q=VCO_2/VO_2$ ), puede dar una idea del sustrato energético empleado y la energía liberada durante la



actividad física. De forma general, cuando dicho cociente toma valores cercanos a 1 es debido a que el sustrato energético empleado son moléculas de hidratos de carbono, y cuando dicho valor se reduce entorno a 0,7 es debido a que fundamentalmente se están metabolizando ácidos grasos libres. Esto se debe a que la cantidad de oxígeno necesario en nuestro organismo para metabolizar una molécula es inversamente proporcional al contenido en carbono de dicha molécula, siendo más fácil oxidar los hidratos de carbono que los ácidos grasos libres, ya que estos requieren más oxígeno. La determinación del cociente respiratorio se realiza, fundamentalmente, en condiciones de laboratorio, mediante el empleo de un analizador de gases y siguiendo, normalmente, un protocolo de esfuerzo determinado.

### **2.1.3 Adaptaciones cardiovasculares al ejercicio físico**

La actividad física ofrece muchos beneficios cardiovasculares, incluida la reducción de la presión arterial, la mejora de los perfiles lipídicos, la modulación de la resistencia a la insulina, y la disminución de la mortalidad general (Jiménez-Jiménez y cols., 2008). Sin embargo, la incidencia de muerte cardíaca u otros eventos adversos también se ha descrito después de ejercicio intenso (Melanson y cols., 2006). Las respuestas nerviosas y neuroendocrinas provocadas por la actividad física determinan un aumento del gasto cardíaco y una disminución de las resistencias vasculares periféricas en el territorio muscular. La repetición de este estímulo provoca a largo plazo adaptaciones tanto miocárdicas como vasculares, que

claramente diferencian a las personas físicamente activas de las sedentarias.

El denominado genéricamente como “corazón del deportista” posee modificaciones tanto de la función sistólica como de la diastólica. El ventrículo izquierdo de la población más activa tiene mejoradas ambas funciones debido especialmente a un mejor aporte y recaptación del  $Ca^{++}$  a las fibras miocárdicas (unión actomiosina) desde el retículo sarcoplásmico, lo que hace que tanto la distensibilidad como la contractilidad estén aumentadas.

Por esta razón el mantenimiento del gasto cardíaco se realiza a expensas de un aumento del volumen latido, mientras la frecuencia cardíaca está reducida en aquellas personas físicamente activas (Whyte, 2008).

Por otro lado, el hecho de que la población más activa tenga una menor incidencia de hipertensión arterial que la más sedentaria (Sato, 2000a), refleja el mejor funcionamiento del sistema circulatorio como adaptación al ejercicio. Una de las adaptaciones más relacionada con la del sistema circulatorio, es la del sistema nervioso autónomo. El ejercicio provoca un incremento lineal de la secreción de catecolaminas, hasta una intensidad que corresponde al umbral anaeróbico, a partir de la cual dicho incremento es exponencial (Ascensão y cols., 2007).

El estímulo mantenido de forma repetida a una intensidad inferior a la del umbral determina una adaptación del sistema nervioso simpático, que aumenta la sensibilidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de tal forma que

su activación precisa de un menor estímulo catecolaminérgico, y por lo tanto una menor secreción de catecolaminas. De este modo, dicha adaptación al ejercicio mantenido determina una menor secreción catecolamínica para una misma intensidad de esfuerzo.

Sin embargo, en las últimas décadas, debido a la falta de marcadores cardíacos específicos era difícil el diagnóstico del daño cardíaco provocado por el ejercicio agudo. Actualmente uno de los principales marcadores de daño, es la creatín quinasa (CK) que se libera tras del daño esquelético y miocárdico (Bar-Shai y cols., 2008), mientras que la isoenzima CK-MB se considera un marcador específico cardíaco (Apple y Tesch, 1989).

Se ha demostrado que el ejercicio de larga duración se asocia con un aumento de marcadores de daño al miocardio, incluso en sujetos sanos sin señales de enfermedad coronaria (König y cols., 2004; Markovitch y cols., 2008).

Varias investigaciones han demostrado también un incremento en la concentración de citoquinas como la IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-1 que puede producir daño cardíaco (Prabhu, 2004; Horton y cols., 2003; Maass y cols., 2002).

#### **2.1.4 Ejercicio físico y factores de riesgo coronario**

Hasta finales del siglo XIX y primeras décadas del XX, la principal causa de mortalidad de la población eran las enfermedades infecciosas. Pero, el descubrimiento de los antibióticos y el cambio en los hábitos de vida

relacionados con el desarrollo industrial y tecnológico, han hecho que en la actualidad la mortalidad por enfermedades cardiovasculares sea el principal problema de salud en el mundo occidental.

Al estudiar los efectos del reposo prolongado se ha observado que uno de los efectos más llamativos es la modificación del sistema cardiocirculatorio (Akova y cols., 2001, Nocon y cols., 2008). Estas modificaciones incluyen el deterioro de la función miocárdica (especialmente la diastólica) y del control del automatismo del árbol circulatorio. La reducción del consumo máximo de O<sub>2</sub> que se observa en estas circunstancias juega un papel muy importante por su trascendencia en el deterioro funcional de otros órganos y sistemas.

Dicha reducción, que puede variar entre un 1% hasta un 26%, dependiendo del tiempo de reposo, está relacionada con la disminución del volumen latido (por reversión de la hipertrofia miocárdica fisiológica) y del gasto cardíaco, en estas circunstancias en las que el retorno venoso también está reducido. La reducción del VO<sub>2</sub> max. también se relaciona con la menor capacidad oxidativa de los tejidos, especialmente de las fibras musculares, según se desprende del menor número de mitocondrias y de la menor actividad enzimática oxidativa.

Desde finales de los años 60, se conocen los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Uno de dichos factores es el sedentarismo, y de hecho gran parte de los restantes factores de riesgo también están relacionados con el mismo. Tan importante ha llegado a ser este hábito que el último eslogan en el Día Mundial de la Salud, promovido

por la OMS, ha sido “Por tu salud, muévete”. Esta organización ha calificado al sedentarismo de nuestros días como una verdadera epidemia no transmisible.

Así la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes tipo II, y la obesidad tienen una mayor prevalencia en las poblaciones más sedentarias (Nocon y cols., 2008). Se observa una menor incidencia de hipertensión y de diabetes tipo II en las poblaciones físicamente activas, concluyendo estos trabajos que la actividad física no es sólo un elemento importante en el tratamiento de estas dos patologías, sino también como prevención de las mismas.

El ejercicio físico regular produce efectos beneficiosos sobre el miocardio y el sistema vascular, con mejora de la distensibilidad y de la contractilidad, aumento de la producción de vasos capilares a nivel muscular. El sedentarismo provoca un deterioro de la funcionalidad del sistema cardiovascular, con efectos deletéreos.

El deterioro del miocardio es menos llamativo que el del sistema muscular esquelético. Esto ha sido atribuido a la mayor protección miocárdica frente al daño inflamatorio y a la utilización de sustratos como el ácido láctico como fuentes energéticas importantes a este nivel. Pero, recordemos que el miocardio es el único músculo que permanece en contracción activa desde el nacimiento hasta la muerte.

De hecho, dicha regularidad en su actividad pudiera ser un importante estímulo para el mantenimiento de una mayor protección frente a dicho

daño, ya que, aunque el sujeto no esté físicamente activo, su miocardio sí lo está permanentemente consiguiendo mantener unas adaptaciones suficientes para combatir los efectos perjudiciales del sedentarismo. Así el principal riesgo que tiene el miocardio sano puede residir en las respuestas de otros sistemas, como el neurohormonal, frente al deterioro ligado al sedentarismo. El caso más evidente es el de la insuficiencia cardíaca. El paciente con insuficiencia cardíaca es el paradigma del sedentarismo. De hecho hasta hace tan solo unas décadas, el ejercicio físico estaba contraindicado y proscrito en estos pacientes (Ascensão y cols., 2007).

En el paciente con insuficiencia cardíaca, la patología miocárdica primaria, determina la puesta en acción de medidas contra reguladoras que tratan de compensar la disminución del gasto cardíaco. Pero, las respuestas compensadoras, inicialmente beneficiosas, acaban por cerrar un auténtico círculo vicioso. Estos pacientes suelen ser mayoritariamente sedentarios, viéndose estimulado dicho hábito por el miedo del propio paciente y de su entorno al ejercicio y a los riesgos que éste pudiera desencadenar. Recordemos que la insuficiencia cardíaca se presenta principalmente en enfermos con edades superiores a 65 años, con un escaso desarrollo muscular, sobrepeso, y patologías, como la artrosis, asociada al envejecimiento que dificultan aún más la capacidad funcional de estos pacientes.

Han sido muchos los estudios que han demostrado la relación existente entre la práctica regular de ejercicio y la disminución de los niveles de presión arterial, tal como queda demostrado en la baja incidencia de

pacientes hipertensos entre los sujetos activos, así como en deportistas cuya condición física fue conseguida mediante el entrenamiento regular (Mundal y cols., 1996; Lim y cols., 2001). En este mismo sentido son clásicos los estudios realizados en los años 70 en más de 3.000 varones, en los que se observó que las presiones sistólicas y diastólicas en reposo de las personas con buena preparación física eran significativamente inferiores a las registradas en individuos con una forma física deficiente (Cooper y cols., 1976). Así mismo, otro estudio comprobó una disminución significativa de las presiones sistólicas y diastólicas en reposo de 66 varones de mediana edad después de un año de entrenamiento aeróbico moderado (Paolone y cols., 1976). Se efectuaron observaciones similares, aunque de menor magnitud, en varones no entrenados, de edades comprendidas entre 52 y 88 años, al cabo de sólo 6 semanas de entrenamiento aeróbico (De Vries, 1979).

Otro de los factores de riesgo cardiovascular es la diabetes por resistencia a la insulina. Estudios realizados han demostrado que el ejercicio físico produce efectos semejantes a los de la insulina en la estimulación de la absorción de la glucosa por parte del músculo esquelético. Agregando además que el ejercicio físico puede constituir una parte importante del programa de tratamiento para la mayoría de los individuos afectados de diabetes de tipo I o de tipo II (Lindstrom y cols., 2006). Pero además de ello, también la actividad física regular se ha demostrado que reduce el riesgo de desarrollar la diabetes mellitus no insulino dependiente, siendo cada vez mayor el número de estudios dirigidos a profundizar en los mecanismos que subyacen a este efecto (Pierce y cols., 2001; Dela y cols.,

2000; Lindstrom y cols., 2006).

De este modo, se ha podido establecer que el efecto de la actividad física en la reducción del riesgo de padecer diabetes mellitus es superior en las personas con volúmenes mayores de ejercicio. La obtención de este efecto necesita intensidades que oscilen entre el 20 y el 60,5 %. Las actividades moderadas, sobre todo de fortalecimiento, aunque también de resistencia son eficaces (Sato, 2000b).

El ejercicio físico es un componente clave para detener la obesidad y las condiciones que de ellas se derivan (Rissanen y cols., 1999), ya que el sobrepeso es un factor de riesgo muy importante y causa de muchas enfermedades comunes como la cardiopatía coronaria, el accidente cerebro vascular, la diabetes, la artrosis, el dolor lumbar y algunos cánceres, además de numerosos problemas psicológicos y sociales (Boden-Albala y cols., 2000).

Los estudios demuestran de manera convincente que, sin una actividad física regular, el control del peso suele resultar imposible de lograr (Rissanen y cols., 1999). De hecho, en un estudio realizado en una población finlandesa, el riesgo de ganancia de peso clínicamente significativo en el transcurso de diez años en el grupo de personas sedentarias era de 2 a 2,5 veces superior al de los sujetos que realizaban una actividad física regular (León y cols., 1996). El grado de actividad necesario, por ejemplo, para mantener el peso después de haberlo perdido es considerable, en torno a los 80 minutos diarios de ejercicio moderado o a los 35 minutos al día de práctica regular en el caso de un estilo de vida



sedentario (Rissanen y cols., 1999).

Pero, además de las patologías cardiovasculares, existen otras cuya incidencia ha aumentado sensiblemente en el último siglo, coincidiendo con la disminución de la actividad física como hábito general de salud. De entre ellas, la osteoporosis, la artrosis, el cáncer y algunos trastornos psíquicos, como la depresión, son algunas de las patologías que responden a este incremento actual.

Hoy en día, en trabajos más recientes se reconoce que, el uso del ejercicio terapia ha adquirido gran relevancia en el tratamiento de un sin número de enfermedades crónicas ligadas al sedentarismo, tanto en su aplicación a pacientes como su posible introducción como coadyuvante en la droga terapia en estadios más avanzados de la enfermedad (Halar, 1999; Arakawa, 1999).

## **2.2 INFLAMACIÓN**

### **2.2.1 Sistema inmune**

El sistema inmune es un complejo sistema integrado por un conjunto de células y moléculas para la defensa de nuestro organismo. La característica principal de éste es la capacidad de reconocer específicamente antígenos y desarrollar una respuesta efectora frente a ellos, provocando su destrucción o anulación funcional. Por tanto, es un eficaz sistema de defensa frente a potenciales microorganismos o agentes extraños que penetren en el cuerpo, o bien frente a transformaciones de

células en tumorales. La clave del sistema inmune está en el reconocimiento de lo propio frente a lo extraño. El sistema inmune nos define y nos defiende, así hace posible la vida. Su fracaso conlleva la enfermedad, incluso la muerte. La eficacia de esta respuesta se fundamenta en la activación de células efectoras, que incluyen a los linfocitos, a las células presentadoras de antígeno o accesorias, y también en la producción de anticuerpos (Prieto y cols., 1997a). Sin embargo, la inadecuada generación de esta respuesta puede producir efectos letales en el propio huésped, provocando reacciones inflamatorias y daño tisular (Prieto y cols., 1997b).

Según Abbas y cols. (2004), el sistema inmunológico esta compuesto por las células y moléculas responsables de la inmunidad, y su función fisiológica es defender el organismo contra microorganismos infecciosos.

El sistema inmune se divide en innato o inespecífico, en el que intervienen fagocitos, células NK y factores solubles y adquirido o específico en el que actúan los linfocitos.

## **2.2.2 Respuestas inflamatorias**

### **2.2.2.1 Respuestas innatas**

La inmunidad innata, también llamada natural, esta compuesta por los mecanismos que existen antes de la infección, capaces de rápidas respuestas a los microorganismos. Los principales componentes de la inmunidad innata son:

- 1- barreras físicas y químicas (epitelios y sustancias antimicrobianas);
- 2- células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) y células matadoras naturales (natural killer);
- 3- proteínas de la sangre (incluidos los miembros del sistema complemento y otros mediadores de la inflamación);
- 4- proteínas que regulan y coordinan muchas actividades de las células de la inmunidad innata, también llamadas de citoquinas (Abbas y cols., 2004).

#### **2.2.2.2 Respuestas adquiridas**

La inmunidad adquirida consiste en mecanismos de defensa altamente especializados, estimulados por la exposición a los agentes infecciosos y tiene la capacidad de aumentar en magnitud y capacidad defensiva en cada exposición sucesiva a un mismo microorganismo. Los componentes de la inmunidad adquirida son los linfocitos, y sus productos (Abbas y cols., 2004).

Las respuestas inmunes son iniciadas por la interacción entre antígenos y los linfocitos T y B maduros que presentan receptores para diferentes antígenos. Los linfocitos T son derivados de la célula madre de la médula ósea pero maduran en el timo, los linfocitos B también son derivados de la médula ósea, pero maduran en la propia medula (Roitt y cols., 2003).

### **2.2.2.3 Tipos de respuestas inmunes adquiridas**

Según Abbas y cols. (2004), tenemos en lo organismo dos tipos de respuestas inmunes adquiridas, designadas como inmunidad celular y inmunidad humoral.

#### Inmunidad Celular

Esta inmunidad es mediada por los linfocitos T que atacan directamente a los gérmenes destruyéndolos por fagocitosis y digestión. Participan también de esta inmunidad los macrófagos, las células NK y las citoquinas (Abbas y cols., 2004; Roitt y cols., 2003).

Los linfocitos T, células efectoras de la inmunidad celular forman dos subpoblaciones: linfocitos T auxiliares ( $CD4^+$ ) y linfocitos T citotóxicos ( $CD8^+$ ). Los linfocitos T reconocen los antígenos protéicos de microorganismos intracelulares que son exhibidos en la superficie de la célula infectada en la forma de péptidos (Abbas y cols., 2004).

La inmunidad mediada por células posee dos tipos principales de reacción:

1. Las células  $CD4^+$  y  $CD8^+$  reconocen los antígenos microbianos y producen citoquinas que activan fagocitos y estimulan la inflamación;
2. Los linfocitos citotóxicos reconocen los antígenos peptídicos y eliminan las células infectadas y la infección (Abbas y cols., 2004).

### Inmunidad Humoral

La inmunidad humoral esta representa por las inmunoglobulinas y linfocitos B. Las inmunoglobulinas están subdivididas en 5 clases: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina E (IgE) y inmunoglobulina D (IgD). La inmunoglobulina A esta presente en alta concentración en la saliva, en las lágrimas y en las secreciones de los bronquios y gástricas. La resistencia a infecciones esta íntimamente ligada a niveles suficientes de inmunoglobulinas, especialmente IgG e IgA (Nieman y Nehlsen-Cannarella, 1991).

Los linfocitos B dan origen a las células plasmáticas que producen y secretan una enorme cantidad de moléculas receptoras, los anticuerpos (Roitt y cols., 2003).

#### **2.2.3 Mediadores inflamatorios**

- *Mediadores celulares* o células que intervienen en dicho proceso, como plaquetas y leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos).
- *Mediadores químicos*: Estos pueden clasificarse según su acción en:
  - ◆ Moléculas efectoras: Radicales libres de oxígeno y enzimas. Destruyen el agente agresor y el tejido lesionado.
  - ◆ Moléculas facilitadoras: Favorecen la vasodilatación, la permeabilidad y la expresión de moléculas de adhesión entre otras acciones. Entre éstas

podemos citar la interleucina-1 (IL-1), prostaglandinas y moléculas de adhesión celular como inmunoglobulinas, integrinas, selectinas y caderinas. Estas últimas promueven la marginación y reclutamiento de los leucocitos circulantes y su adherencia al endotelio.

◆ Moléculas inhibitoras: que controlan el excesivo desarrollo del proceso inflamatorio.

Los mediadores químicos también se pueden clasificar según su localización:

*Factores tisulares:*

◆ Mediadores almacenados en las células: Los más importantes son la histamina (contribuye a la vasodilatación) y enzimas como la mieloperoxidasa.

◆ Mediadores sintetizados de novo: como radicales libres (RL), óxido nítrico (NO), derivados de fosfolípidos (prostaglandinas, tromboxanos...) o citoquinas.

*Factores plasmáticos*, como los sistemas de complemento que intervienen en la permeabilidad, vasodilatación, acumulación de leucocitos.

### **2.2.3.1 Mieloperoxidasa (MPO)**

La mieloperoxidasa (MPO) es la proteína más abundante en los neutrófilos y la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno

y cloruro a ácido hipocloroso. Es un enzima ampliamente distribuido en el organismo, siendo sus fuentes fundamentales los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos (Bradley y cols., 1982). En los neutrófilos se encuentra localizado a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos, constituyendo el 2-5 % de las proteínas totales de los mismos (Márquez y cols., 1990).

Estructuralmente es una glicoproteína tetramérica constituida por 4 subunidades que forman dos homodímeros. Cada uno de ellos contiene una subunidad  $\alpha$  (pesada) de aproximadamente 59 kDa y una subunidad  $\beta$  (ligera) de aproximadamente 14 kDa. Su actividad es proporcional al número de neutrófilos presentes en el tejido y, por tanto, puede utilizarse como índice de migración leucocitaria e indirectamente como parámetro de inflamación (Junger y cols., 1993; Huang y cols., 2008). Así, se ha demostrado un incremento significativo de su actividad en varios procesos patológicos en relación con un aumento del riesgo de estrés oxidativo, tal y como ocurre en el caso de las enfermedades infecciosas sistémicas o locales, enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal, o en los accidentes isquémicos cerebrales (Komatsu y cols., 1992; Mochizuki y cols., 2010; Pang y col., 2010).

### **2.2.3.2 Citoquinas**

Son moléculas solubles no específicas producidas mayoritariamente por los leucocitos y que intervienen en la regulación de las células del sistema

inmune y en los procesos inflamatorios. Las citoquinas incluyen a las interleucinas, linfocinas, interferones y quimiocinas.

Ya en 1974 se utilizó el término "cytokine" para identificar un grupo de polipéptidos con acciones locales y sistémicas, que participan en el control de diversas poblaciones celulares y que no derivan de los linfocitos.

Actualmente, se consideran como citoquinas un grupo de proteínas inducibles que modulan la actividad (metabolismo, síntesis y secreción de otras proteínas), proliferación y diferenciación celular (Yentis, 1995).

Las citoquinas son péptidos señalizadores que se producen en respuesta a la agresión de un tejido e intervienen en la respuesta inflamatoria. En general, éstas actúan a través de receptores de alta afinidad, que se expresan en la superficie celular. La mayoría de ellas son moléculas multifuncionales que ejercen diferentes acciones en las distintas células sobre las que actúan. Los efectos y la síntesis de las citoquinas no se limitan al sistema inmune, ya que se ha observado que estas moléculas pueden regular la función de las células de otros órganos y tejidos.

Es decir las citoquinas tienen la capacidad de estimular la comunicación paracrina o autocrina, que pueden llevar a una respuesta más larga de producción o amplificación de las mismas citoquinas (Smith, 2000).

Existen dos tipos de citoquinas:



- Citoquinas antiinflamatorias, son producidas en el proceso inflamatorio, inducen su propia producción y son responsables de la correcta terminación de la respuesta inflamatoria.
- Citoquinas proinflamatorias, responsables del inicio de la respuesta inflamatoria. Estas moléculas suelen actuar conjuntamente con otras citoquinas como la IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 e INF- $\gamma$ .

#### Citoquinas proinflamatorias

Las citoquinas proinflamatorias son un grupo de péptidos estructurales menores de 30 kDa producidas por células del sistema inmunitario en respuesta a diversos estímulos (Nielsen y Rask-Madsen, 1996; Kolios y cols., 1998; Rogler y Andus, 1998; Libby y cols. 2010).

Actúan a nivel local y sistémico induciendo la producción de otros mediadores e iniciando la cascada inmunológica (Radford-Smith y Jewell, 1996). Destacan las siguientes citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ):

Interleucina 1 (IL-1). Es una proteína globular de 17,3 kDa, que se sintetiza con la parte terminal C de la proteína precursora inactivada biológicamente conteniendo un propéptido de 116 residuos de amino ácidos. Con sus dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , actúan sobre dos tipos de receptores: los receptores I y II. La interleucina 1 (IL-1) es una citoquina proinflamatoria producida por una serie de células, incluyendo los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas. Fue inicialmente definida como un polipéptido derivado de los

fagocitos mononucleares que potencializaba las respuestas de los timocitos para activadores policlonales, como coestimuladores de activación de las células T. Pero actualmente se sabe que la principal función es mediar la respuesta inflamatoria del huésped de la inmunidad innata (Abbas y cols., 2004).

Interleucina 6 (IL-6). Es una citoquina multifactorial que ha sido implicada en gran variedad de funciones celulares. La interleucina-6 tiene efectos importantes sobre los hepatocitos, los linfocitos B y fagocitos mononucleares responsables de la producción de otras citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$ ) (Pedersen y Hoffman-Goetz, 2000; Córdova y Álvarez-Mon, 2001). Es una citoquina pleotrópica (22-28 kDa) que es sintetizada como un precursor de proteína de 212 aminoácidos (aa), con una señal de secuencia de 28-aa y un segmento maduro de 184-aa (Pedersen y cols., 2003). Es producida por diferentes células, pero la principal fuente "in vivo" es la estimulación de los monocitos, macrófagos, fibroblastos y células vasculares endoteliales (Akira y cols., 1993), indicativo de una regla en la modulación del sistema inmune. Otras células conocidas que expresan IL-6 incluyen los queratinocitos, osteoblastos, células T, células B, neutrófilos, eosinófilos, células mástil, células musculares lisas (Akira y cols., 1993) y células músculoesqueléticas (Nagaraju y cols., 1998). En el año 2000, se hizo claro que la contracción del músculo esquelético humano libera cantidades significativas de IL-6 en la circulación durante el ejercicio (Pedersen y Febbraio, 2008). Cuando el ejercicio físico realizado es ligero, parece ser que existe un aumento de IL-6 pero no de IL-1 y TNF- $\alpha$ . Sin embargo, tras el ejercicio físico intenso, la

elevación de los niveles séricos de IL-6 puede aumentar hasta 100 veces respecto a niveles basales, inmediatamente después del ejercicio (Pedersen y Hoffman-Goetz, 2000; Córdova y Álvarez-Mon, 2001; Keller y cols., 2005; Pedersen y cols., 2007).

Además, en estos casos el aumento intenso se correlaciona con la actividad de la enzima creatin kinasa que es un marcador indirecto de daño muscular (Pedersen y Hoffman-Goetz, 2000).

Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) Es un importante mediador inflamatorio que comparte un mecanismo de acción y sistema de actuación similar a la IL-1. Se expresa como una proteína transmembrana de 26 kDa, siendo preciso para activarse, que se libere por la acción de una enzima proteolítica denominada enzima convertidora de TNF- $\alpha$ .

El TNF tiene un papel central al iniciar la cascada de otras citoquinas y factores que estructuran la respuesta inmune para las infecciones. La extensa variedad de los efectos atribuidos por la ubicuidad de sus receptores, sus habilidades para activar gran cantidad de vías de transducción y sus habilidades para inducir o suprimir una formación de genes incluyendo los factores de crecimiento, citoquinas, factores de transcripción, receptores y proteínas de fase aguda (Hayakawa y cols 2006). Esta citoquina induce la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales, promoviendo así, la migración de leucocitos hacia los focos de inflamación (Moldeveanu y cols., 2001).

A pesar de existir alguna controversia debido al período de evaluación de esas citoquinas en el plasma, se ha encontrado un aumento de TNF- $\alpha$  después de un ejercicio intenso de larga duración (Petersen y cols., 2009).

### **2.2.3.3 Óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa simple, habitualmente encontrada en el aire atmosférico en pequeñas cantidades, altamente tóxica debido a la presencia de radical libre (electrón extra) que la hace un agente químico altamente reactivo.

En disolución, el NO tiene una vida media de menos de 10 segundos debido a la su rápida oxidación a nitrito y nitrato. El NO se une a la hemoglobina y otras proteínas que contienen el núcleo hemo llevando a término su actividad biológica. Por su naturaleza química el NO es hidroliposoluble y por lo tanto, su difusión a través de células y tejidos sólo se encuentre limitada por el propio coeficiente de difusión de los mismos, así como por la rapidez con que se degrada en presencia de oxihemoglobina (Henry y cols., 1993).

Tras su oxigenación, el NO se transforma en sus metabolitos estables, nitratos y nitritos, que permiten medir de forma indirecta su producción. Además, el NO también es capaz de interactuar con el anión superóxido dando lugar a peroxinitrito, el cual a un pH fisiológico capta un protón dando lugar al ácido peroxinitrito. Éste, rápidamente produce dióxido de nitrógeno y radicales hidroxilo, los cuales actúan como radicales libres y potentes agentes oxidantes (Beckman y cols., 1990).

### Producción enzimática del NO

El NO es sintetizado por la oxidación esteroespecífica del aminoácido L-arginina en una reacción catalizada por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintetasas (NOS), utilizando los siguientes cofactores: flavín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD), tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y protoporfina IX. Estas enzimas actúan incorporando O<sub>2</sub> para formar NO y L-citrulina en proporciones similares, de forma que, aparentemente, esta reacción constituye una L-arginina N<sup>o</sup> C<sup>G</sup> dioxigenación. Este enzima requiere una molécula de O<sub>2</sub> y otra de NADPH, además de la presencia de tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como cosustratos y, flavin-mononucleótido (FMN), flavin-adenin-dinucleótido (FAD) y tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como cofactores (Nathan y Xie, 1994). Derivado de esta reacción se produce NO y citrulina en cantidades equimoleculares (Moncada y Higgs, 1993).

La enzima NOS existe en tres isoformas, es decir, NOS neuronal (nNOS; tipo I), NOS inducida (iNOS; tipo II) y NOS endotelial (eNOS; tipo III). La actividad de las isoformas constitutivas es transitoria debido a su dependencia de la concentración celular de Ca<sup>2+</sup>, por lo que tanto eNOS como nNOS producen bajas concentraciones de NO (en rango picomolar) que permanecen con actividad durante cortos periodos de tiempo.

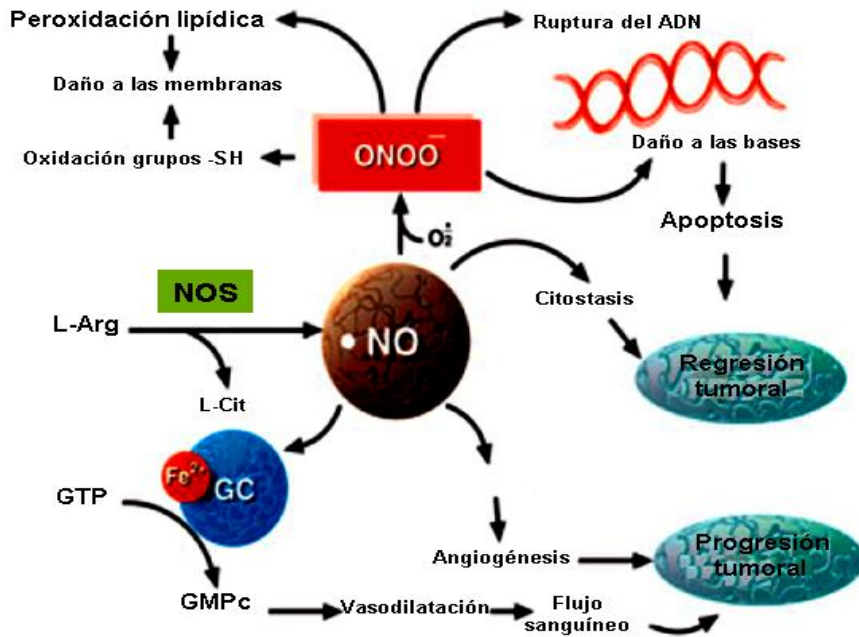
Intervienen en procesos homeostáticos como la regulación de la presión arterial, neurotransmisión o la peristalsis gastrointestinal.

Por el contrario, la iNOS es independiente de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto, sintetiza grandes concentraciones de NO (en rango nanomolar), destinadas a la defensa contra microorganismos e implicadas en el proceso inflamatorio (Nathan y Xie, 1994). La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS tipo II) es producida por gran variedad de células y tejidos tras la exposición a citoquinas proinflamatorias (como IL-1 o TNF- $\alpha$ ) y productos bacterianos. El gen se localiza a nivel del cromosoma 17 y la expresan neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos T, células vasculares de la capa muscular lisa del intestino y enterocitos. La producción del NO mediado por iNOS se regula en un proceso en el que se encuentra implicada la activación del llamado factor de transcripción nuclear- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) comentado anteriormente. Determinadas citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 o IL-17; lipopolisacárido o bacterias; virus o adenovirus; y otros factores, inducen la expresión de iNOS en las células epiteliales a través de la activación de NF- $\kappa\text{B}$ . El NF- $\kappa\text{B}$  induce un incremento coordinado de la expresión de genes proinflamatorios que incluyen citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, G-CSF, M-CSF), quemoquinas (IL-8, proteína quemotáctica de macrófagos), enzimas que generan mediadores de inflamación (COX-2, iNOS, 5-lipooxigenasa, fosfolipasa A2), receptores inmunes (receptor de IL-2, cadena  $\beta$  del receptor de células T) y moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina). En contraste con esto, la activación de NF- $\kappa\text{B}$  por TNF- $\alpha$  es inhibida por donantes de NO, lo que sugiere un efecto “feed-back” negativo en la expresión de iNOS (Vila del Sol y cols., 2007).

### Acciones fisiológicas del NO

El papel del NO en el proceso inflamatorio es controvertido y ambiguo. Por un lado tiene una acción antiinflamatoria, pero por otro, tiene un papel fundamental en la cascada inflamatoria y en desencadenar así disfunción tisular. El hecho de dar lugar a unas u otras acciones está fundamentado en la variedad de propiedades químicas del NO y de sus derivados, y en su capacidad de producir efectos opuestos en función de su concentración (Luiking y cols., 2010).

El NO en bajas concentraciones interacciona directamente con sus moléculas diana, teniendo funciones reguladoras, protectoras y antiinflamatorias. En concentraciones suprafisiológicas, es capaz de interactuar con oxígeno molecular ( $O_2$ ) o anión superóxido ( $O_2^-$ ), produciéndose diversas moléculas responsables de los procesos inflamatorios (Luiking y cols., 2010).



**Esquema 2.** Síntesis y funciones del óxido nítrico. Fuente: Serrano y cols., 2004.

A nivel cardiovascular interviene en la regulación del flujo sanguíneo y la presión arterial produciendo un tono vasodilatador como consecuencia de la activación de las células endoteliales por estímulos físicos (como son el flujo pulsátil y el estrés de cizallamiento), o por su liberación por los terminales nerviosos.

El NO también inhibe la agregación plaquetaria por un mecanismo dependiente de GMPC, actuando de forma sinérgica con la prostaciclina que lo realiza a través del adenilato monofosfato cíclico (AMPc). Además



inhibe la adhesión de las plaquetas a la pared vascular. En el aparato respiratorio produce vasodilatación e interviene en la motilidad broncociliar y en la secreción bronquial de moco. En el sistema nervioso central se ha implicado en los procesos de memoria y aprendizaje, visión, olfato y nocicepción (Toda y cols., 2009). En el sistema nervioso periférico constituye uno de los principales mediadores del sistema no adrenérgico no colinérgico responsables del control de la motilidad gastrointestinal, del mecanismo de erección del pene y de la motilidad vesical, entre otros (García y Srein, 2006).

En el tracto gastrointestinal se encuentra implicado en el transporte de agua y electrolitos siendo capaz de favorecer su reabsorción por acción directa sobre los enterocitos e indirecta, a través de la regulación del flujo sanguíneo. Asimismo, regula la inmunidad intestinal al regular a la baja la liberación de diferentes mediadores inflamatorios por los mastocitos como el factor activador plaquetario (PAF), TNF- $\alpha$ , histamina, eicosanoides, citoquinas, actúa sobre las proteínas contráctiles del citoesqueleto de las células epiteliales encargadas del mantenimiento de las uniones intercelulares, modula la reparación tisular al incrementar el depósito de colágeno por parte de los fibroblastos, y promueve la neoangiogénesis (Wallace y Miller, 2000).

#### **2.2.3.4 Ciclooxygenasa (COX)**

La ciclooxygenasa (COX) es la enzima que cataliza el paso limitante en la formación de prostaglandinas y tromboxanos. Se trata de una enzima

bifuncional que produce tanto la oxidación del AA para formar PGG<sub>2</sub> por introducción de oxígeno molecular y formación de ciclopentano (actividad ciclooxigenasa), como la reacción de peroxidación que transforma la PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> al reducir el grupo hidroperóxido del C15 a grupo hidroxilo (-OH) (actividad endoperoxidasa).

Es por ello que se denomina también endoperoxido sintasa. A partir de la PGH<sub>2</sub>, y gracias a la actividad de las isomerasas presentes en cada uno de los diversos tejidos y células, se forman las distintas prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  y PGI<sub>2</sub> o prostaciclina) y el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). A principios de los años 90, se demostró la existencia de dos isoformas distintas de COX que difieren en su patrón de expresión y en su función biológica: la COX-1 y la COX-2 (Fu y cols., 1990; Xie y cols., 1991). Existe una tercera isoforma COX-3 con un papel predominante en el sistema nervioso central (Botting y Ayoub, 2005).

### Ciclooxigenasa 2 (COX-2)

La COX-2 (72 kDa) no se detecta de forma tan importante en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas, aunque es constitutiva en niveles bajos en el cerebro, riñón, colon, durante la ovulación y la implantación del blastocisto y en endotelio vascular, entre otros. Su expresión puede ser inducida por estímulos proinflamatorios y mitogénicos como IL-1, TNF- $\alpha$ , lipopolisacáridos (LPS), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de crecimiento de

fibroblastos (FGF), a nivel de monocitos, macrófagos, sinoviocitos, fibroblastos, condrocitos, osteoblastos y células endoteliales.

La expresión de COX-2 aumenta en procesos inflamatorios y de proliferación celular, siendo normalmente transitoria y recuperando los niveles basales en 24-48 horas. Su gen se encuentra en el cromosoma 1 tanto en humanos como en ratones. El promotor de su gen contiene una caja TATA y sitios de unión para varios factores de transcripción incluyendo el NF- $\kappa$ B, el factor nuclear para la expresión de interleuquina 6 y la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (Mbonye y Song, 2009). Por el contrario, se ha descrito que los glucocorticoides, IL-4, IL-13 y la citoquina antiinflamatoria IL-10 pueden inhibir la expresión de este enzima (Mbonye y Song, 2009). Además tiene un mecanismo de autorregulación, pudiendo los prostanoïdes generados por la COX-2 estimular la expresión de este enzima. De esta manera, prostaglandinas producidas en las zonas de inflamación como la prostaglandina 2 (PGE2) pueden potenciar su expresión (Hinz y cols., 2000ab; Maldve y cols., 2000; Bolli y cols., 2002).

#### **2.2.3.5 Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1)**

La adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular es el paso fundamental para su extravasación durante la inflamación. Este proceso está mediado por la molécula de adhesión E-selectina. La unión firme y la migración transendotelial dependen de la interacción entre la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de citoadhesión vascular-1

(VCAM-1) y las integrinas antígeno de función linfocitaria-1 (LFA-1, CD11a/CD18) y antígeno de activación tardía (VLA-4, CD49/CD29) sobre los leucocitos.

La molécula ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1 ó CD54) es una glucoproteína que cuenta con cinco dominios extracelulares constantes. Está presente a niveles bajos en la mayoría de las células endoteliales.

Estimulada por citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$ ), los leucocitos migran a través del endotelio tras la interacción entre moléculas de adhesión (CAM), expresado en las células endoteliales y los correspondientes receptores presentes en los leucocitos (Smith y cols., 1989; Adams y Shaw, 1994).

Las moléculas de adhesión endoteliales pueden desprenderse de la superficie celular a la circulación y sus valores solubles pueden reflejar su expresión sobre la superficie endotelial. La respuesta inflamatoria aguda es un importante componente en la patogenia del daño miocárdico durante el síndrome coronario agudo y la disfunción endotelial está especialmente relacionada con el reclutamiento de los leucocitos durante la formación de la lesión aterosclerótica. En la práctica clínica se ha demostrado la utilidad de la detección sérica de diferentes marcadores de la inflamación, como la proteína C reactiva, el amiloide A, la troponina T y las citocinas, como las interleucinas (IL) 1 y 6 asociadas a la patogenia del síndrome coronario agudo y su diagnóstico diferencial, por lo que algunos de ellos se han utilizado como marcadores diagnósticos y pronósticos (Apple y cols., 2005). En este síndrome también se han evaluado los valores de las

moléculas de adhesión endoteliales solubles, como marcadores séricos característicos de la disfunción endotelial e inflamación, con resultados controvertidos.

La molécula ICAM-1 puede ser liberada (específica e inespecíficamente) por el tejido dañado o inflamado, como consecuencia de una proteólisis inespecífica. Esta observación podría explicar los valores elevados de ICAM-1 en pacientes con síndrome coronario agudo y sus concentraciones más elevadas en el infarto agudo de miocardio (Apple y cols., 2005).

La respuesta metabólica en la actividad física esta relacionada con el tipo, intensidad y duración del ejercicio. Las especies reactivas de oxígeno (ERO), generados durante los ejercicios agudos, son capaces de reaccionar con membranas, causando daños a las células y los tejidos y estimulando la expresión de la ICAM-1 en las células endoteliales (Witkowska, 2005).

### **2.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**

Los factores de transcripción son proteínas de bajo peso molecular que estimulan la transcripción de genes que intervienen en el desarrollo, crecimiento y envejecimiento celular, mediante la unión específica a regiones promotoras presentes en los mismos. Las modificaciones *redox* actúan como importantes mecanismos de regulación de algunos de estos factores, de modo que se ha observado que una variación del estado *redox* de la célula puede alterar la función de los mismos de forma directa o mediada por otras señales como procesos de fosforilación/desfosforilación

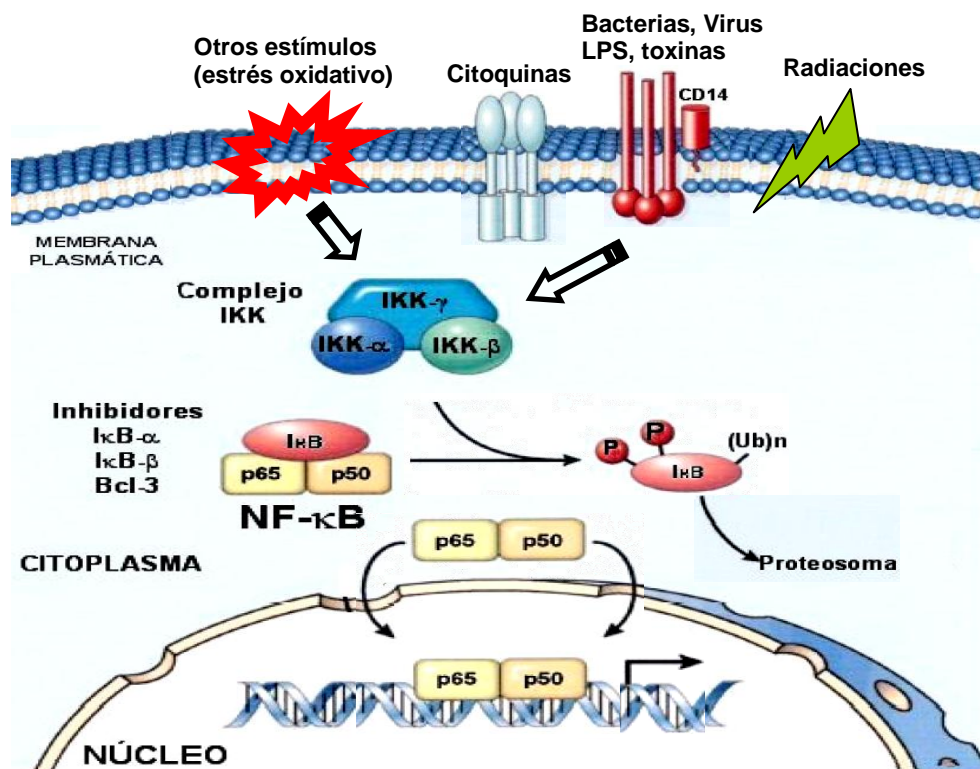
o glicosilación (Israel, 2000).

### **2.3.1 Factor de transcripción nuclear $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)**

Existen muchas rutas de señalización intracelular, bien caracterizadas, que conducen a la activación de la transcripción de genes, es decir, que modulan la activación de factores de transcripción. De estas, la correspondiente al NF- $\kappa$ B, es única en cuanto a la rapidez de su activación, su inusual mecanismo de regulación y el actual conocimiento del mismo, que abarca desde el entendimiento de su estructura molecular, hasta las funciones fisiológicas de cada uno de sus componentes. Se sabe desde hace tiempo que este factor responde a los cambios *redox* de la célula, viéndose inducida la ruta de activación del mismo cuando se da una situación de estrés oxidativo con un incremento en la producción de citoquinas y moléculas de adhesión (ICAM-1), que más bien tienen que ver con procesos de tipo inflamatorio (Ali y Mann, 2004).

Bajo la denominación genérica de NF- $\kappa$ B se agrupan un conjunto de proteínas, que pertenecen a la denominada familia Rel, estructuralmente relacionadas y evolutivamente conservadas, las cuales se organizan formando dímeros y que reconocen una determinada secuencia de ADN. Numerosos estudios han revelado que este factor se expresa de forma ubicua en todos los tipos celulares, desempeñando un papel central en la regulación de la expresión de genes involucrados en procesos biológicos tales como la respuesta inmune e inflamatoria, la apoptosis y situaciones

relacionadas con el estrés, que requieren de una respuesta rápida a nivel de expresión génica.



**Esquema 3.** Ruta de activación del NF-κB. Fuente: Núñez-Naveira y cols., 2007.

El NF-κB se encuentra en condiciones normales en forma inactiva, secuestrado en el citoplasma celular debido a la interacción con su proteína inhibidora (IκB). El factor de transcripción NF-κB puede ser activado por una gran variedad de estímulos, lo cual explica su ubicua localización y su función central no sólo en las respuestas inmune e

inflamatoria sino también en muchos otros procesos biológicos. El aumento de su formación en el músculo después del ejercicio ha sido demostrado en animales e indirectamente en los seres humanos (Pedersen y Febbraio, 2008). La presencia de estos factores provoca un aumento de las I $\kappa$ B quinasas específicas (IKK $\alpha/\beta$ ) que fosforilan I $\kappa$ B y que provocan una rápida ubiquitinación y degradación del I $\kappa$ B en el proteosoma. La desaparición del inhibidor provoca una traslocación del complejo hacia el núcleo celular donde se une a una región específica ( $\kappa$ B) en la región promotora de los genes diana.

### **2.3.2 Genes regulados por el NF- $\kappa$ B**

El NF- $\kappa$ B aumenta la expresión de genes inflamatorios que codifican para las citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, e IL-12, entre otras), quimiocinas (IL-8), factores de crecimiento y moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, y E-selectina) (Zerfaoui y cols 2008). Las citoquinas estimuladas por NF- $\kappa$ B, como son la IL-1 y el TNF- $\alpha$  pueden a su vez activar por sí mismas la ruta del NF- $\kappa$ B, por lo que se establece un bucle positivo que amplifica la respuesta e intensifica el proceso inflamatorio. La IL-2 también se ve inducida por acción del NF- $\kappa$ B, por lo cual se ve incrementada la proliferación y diferenciación de los linfocitos-T.

También por acción del NF- $\kappa$ B se ven activados los genes para enzimas cuyos productos participan en la patogénesis del proceso inflamatorio, incluyendo la forma inducible de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) que sintetiza óxido nítrico y la ciclooxigenasa inducible (COX-2) que está



implicada en la síntesis de prostanoïdes (Ali y Mann, 2004; Buzzelli y cols., 2008).

Otros procesos en los que el NF- $\kappa$ B tiene un papel relevante son aquellos relacionados con la proliferación celular (Manna y Aggarwal, 2000) y la apoptosis (Kucharczak y cols., 2004).

## **2.4 INFLAMACIÓN E EJERCICIO**

Debido a la extensa investigación en las últimas décadas, los efectos del ejercicio sobre el sistema inmunológico están bien documentados. Sin embargo, hay dudas acerca de las alteraciones de los mecanismos moleculares subyacentes (Niebauer, 2008). El ejercicio de resistencia ha demostrado que induce una respuesta inflamatoria sistémica y desencadena una supresión del sistema inmune, dando como resultado un incremento en la frecuencia de infecciones, principalmente a nivel del sistema respiratorio, en los atletas de alto rendimiento. Al ser el ejercicio físico un agente estresante, así como la cirugía, quemaduras, hipoxia o hipertermia, éste induce cambios importantes en el sistema celular inmune (De la Fuente, 2002). Las consecuencias del ejercicio en el sistema inmunitario dependerán de:

- ❖ tipo, intensidad y duración de la actividad física realizada.
- ❖ el estado previo del individuo (no es lo mismo una persona sedentaria que un deportista habitual).

- ❖ el momento de la valoración inmunitaria (inmediatamente tras la finalización de una actividad física o transcurrido un tiempo después de haber finalizado la misma).
- ❖ el estrés que suponga a cada persona la realización de la actividad física. Esto adquiere especial relevancia ya que el ejercicio físico es un modelo de estrés clásicamente establecido (Salit, 2003).

La intensidad, la duración y el tipo de ejercicio (por ejemplo, ejercicios de fuerza frente a resistencia) y ejercicio agudo vs ejercicio crónico puede influir en los diversos parámetros inmunológicos, que también están asociados con enfermedades inflamatorias crónicas (Pedersen y Hoffman-Goetz, 2000; Petersen y Pedersen, 2005; Timmons, 2005).

Según Pedersen y Hoffman-Goetz, (2000) el ejercicio agudo tiene un efecto en el sistema inmunológico tanto durante como después del mismo. Durante el ejercicio los músculos producen y liberan una elevada concentración de IL-6, y su niveles plasmáticos pueden aumentar de forma significativa. Leucocitos como los neutrófilos, linfocitos (incluidos los T, B y células NK) y los monocitos, así como las concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva (PCR) y tanto las citocinas pro- como las anti-inflamatorias principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1ra, IL-10 y sTNF-r pueden aumentar varias magnitudes durante una sesión aguda ejercicio. Al finalizar el ejercicio intenso, los neutrófilos y los monocitos pueden seguir aumentando en el período de recuperación, mientras que el resto de leucocitos disminuyen su número y las concentraciones plasmáticas de las citocinas mencionadas se mantienen elevadas durante algunas horas más.

Ejercicios extremos, tales como maratones, y el sobreentrenamiento se asocia con una depresión de la función inmune (Gleeson, 2007), que puede aumentar en el deportista de elite la susceptibilidad a la infección. Los marcadores proinflamatorios de TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  no parecen aumentar en períodos cortos de ejercicio intenso o moderado, aunque los resultados son contradictorios (Pedersen y Hoffman-Goetz, 2000). Es evidente, pues, que un ejercicio agudo ejerce diversos efectos sobre el sistema inmunológico pero que son generalmente de naturaleza transitoria.

Se ha descrito que el período de supresión temporal, denominado como "open window", microorganismos, virus especialmente, pueden aparecer y desarrollar procesos infecciosos.

Los resultados obtenidos sobre los efectos del ejercicio regular o crónico en los niveles basales de inflamación recomiendan el ejercicio como terapia anti-inflamatoria (Bruunsgaard, 2005, Mathur y Pedersen, 2008). Sin embargo, de igual forma que en ejercicios agudos, el efecto del entrenamiento sobre los marcadores inflamatorios también parece depender de la intensidad del ejercicio, nivel de entrenamiento, la edad y la presencia de alguna patología (Gleeson, 2007).

Las concentraciones basales de los marcadores inflamatorios circulantes no parecen diferir mucho entre los adultos sanos entrenados y no entrenados (Gleeson, 2006; Timmons y cols, 2009). Sin embargo los niveles de reposo de las células NK, un subtipo de linfocitos importante y muy sensible al ejercicio agudo, se eleva con un entrenamiento de baja

intensidad y así se ha demostrado un incremento en su actividad citolítica en personas entrenadas, en comparación con controles sanos no entrenados. Un entrenamiento de baja intensidad en personas ancianas sanas puede reducir los niveles de reposo de los marcadores proinflamatorios como el número de los monocitos, PCR e IL-6 (Nicklas y cols., 2008; Timmermann y cols., 2008).

Por otra parte, parece que el entrenamiento puede atenuar o amortiguar la respuesta de una sola sesión de ejercicio (Gokhale y cols., 2007). Así un ejercicio de intensidad moderada se asocia con efectos anti-inflamatorios, pero uno extenuante afecta los niveles de reposo de los marcadores inflamatorios durante y después de un período de entrenamiento intenso (Gleeson, 2006).

Además de los problemas para tratar de comprender los efectos agudos de sesiones individuales de ejercicio y los efectos crónicos del entrenamiento físico regular es necesario prestar una atención especial a los efectos del ejercicio en lo que respecta a la edad y el género (Timmons y cols., 2006). Y sobre todo la aplicación de ejercicio físico en pacientes con enfermedades caracterizadas por una inflamación crónica.

A la luz del conocimiento acerca de los efectos del ejercicio sobre la función inmunitaria y las citoquinas en los individuos sanos, es lamentable que no se preste más atención a los pacientes con una enfermedad inflamatoria crónica en los que la inflamación está, en cierta medida, desregulada. La mayoría de estudios han examinado los efectos beneficiosos del ejercicio en términos generales de salud, de fuerza

muscular, en la reducción de riesgo de enfermedades crónicas (por ejemplo, enfermedad cardiovascular), en el control de la obesidad y diabetes tipo 2, en la autoestima y la imagen corporal.

De hecho, Pedersen y Saltin (2006) realizaron una revisión bibliográfica relativa a los efectos del ejercicio como terapia en varias enfermedades crónicas, con el fin de presentar las pruebas de la utilización del ejercicio como terapia. Los efectos de ejercicio se clasificaron en efectos sobre la patogénesis, los síntomas específicos de la enfermedad, condición física o fuerza y calidad de vida. Sin embargo, las recomendaciones basadas en estas evidencias no pudieron realizarse para cada patología. En resumen, el ejercicio tiene muchos efectos beneficiosos para los pacientes con una enfermedad crónica inflamatoria, pero el impacto del ejercicio sobre los parámetros inflamatorios se mantiene poco estudiado.

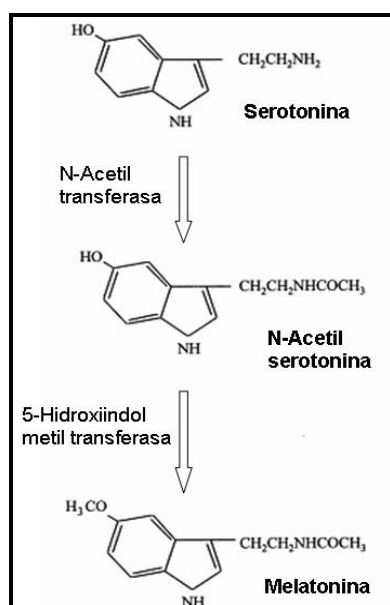
## **2.5 MELATONINA**

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT) es una indolamina descrita inicialmente por McCord y Allen (1917) y aislada por primera vez por Lerner y cols (1958) a partir de extractos de la glándula pineal. Se le conoce como melatonina debido a la capacidad que poseía para aclarar la piel de anfibios mediante la agregación de **melanina** en los **melanóforos** y a que es un derivado metabólico de la **serotonina**.

### 2.5.1 Biosíntesis de la melatonina

La melatonina aparece muy pronto en la escala evolutiva (Macías y cols., 1999). En los mamíferos, la síntesis de melatonina se descubrió en la glándula pineal (Reiter, 1991a; Erren y cols., 2003; De Filippis y cols., 2008).

La cascada bioquímica que da lugar a su síntesis comienza con la captación del aminoácido esencial triptófano, procedente del torrente circulatorio. Éste se transforma, en primer lugar, en 5-hidroxitriptamina o serotonina, por acción sucesiva de la L-triptófano hidroxilasa y la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa.



**Esquema 4.** Síntesis de melatonina en la glándula pineal.

La serotonina es acetilada por la N-acetiltransferasa o NAT (enzima limitante del proceso de síntesis de la melatonina). La metilación sufrida por la N-acetilserotonina gracias a la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) produce la molécula de melatonina (Weissbach y cols., 1960; Axelrod y Weissbach, 1961; Axelrod, 1974).

La melatonina se produce de manera circadiana, presentando unos niveles máximos durante la noche (Pang y cols., 1980; Aimoto y cols., 1985; Menéndez-Peláez y cols., 1987; Reiter, 1991a; Reiter, 1991b). En la actualidad, se ha demostrado la presencia, en prácticamente todos los tejidos del organismo, de la expresión de los genes que codifican los enzimas clave de la síntesis de melatonina (NAT y HIOMT) (Stefulj y cols., 2001); por lo que cada tejido podría producir la melatonina que necesita en cada momento, sin depender de la melatonina circulante. Por tanto, además de en la glándula pineal, la melatonina es sintetizada en mamíferos en una gran variedad de tejidos como la retina, la glándula harderiana, la mucosa del intestino, el cerebelo, el epitelio respiratorio, el hígado, el riñón, el timo, el tiroides, el páncreas, los ovarios, el cuerpo carotideo, la placenta y el endometrio, así como en células no endocrinas tales como las células NK (natural killer), eosinófilas, plaquetas y endoteliales (Hardeland y Poeggeler, 2003). Además, la melatonina es ubicua en el reino animal y vegetal, encontrándose en muchos tipos de organismos, como bacterias, eucariotas unicelulares, microalgas, plantas, invertebrados y vertebrados, al igual que en diversos comestibles como vegetales, frutas, hierbas medicinales y semillas (Hardeland y Poeggeler, 2003; Macías y cols., 1999). En el interior de los orgánulos subcelulares, la

concentración de melatonina puede variar, y algunos autores han descrito que los niveles de esta indolamina en núcleo y en mitocondria pueden ser significativamente mayores que en plasma (Menéndez-Peláez y Reiter, 1993; Acuña-Castroviejo y cols., 2003).

### **2.5.2 Metabolismo de la melatonina**

La melatonina, fundamentalmente en la retina, aunque también en el hígado, puede sufrir desacetilación y desaminación hasta convertirse en ácido 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol (Cahill y Besharse, 1989). Otra vía de degradación sería la que tiene lugar en el cerebro, plexo coroideo y pineal.

En este caso, la melatonina se transforma primero en N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) y después en N1-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK), siendo esta una de las vías más importantes de metabolización de la melatonina en cerebro de mamíferos (Hirata y cols., 1974; Fujiwara y cols., 1978).

AFMK es el producto que se forma cuando la melatonina depura  $H_2O_2$  (Tan y cols., 2000). Igualmente importante es el hecho de que AFMK es también un efectivo depurador de  $HO\cdot$ . Por lo tanto, no sólo la melatonina pero también alguno de sus metabolitos es altamente eficiente en reducir el daño producido por los radicales libres. Nos referimos a esto como la “cascada antioxidante de la melatonina”, un proceso que incrementa mucho la eficiencia de su ubicua actividad como depurador de radicales libres y antioxidante. Con este mecanismo el radical catión indolilo (radical



de la melatonina), elimina, en realidad, dos radicales libres a la vez: un HO• y un O<sub>2</sub>.

La melatonina también puede transformarse de forma no enzimática en AMK, cuando depura en primer lugar un radical hidroxilo (HO•) y en segundo lugar un radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Hirata y cols., 1974; Fujiwara y cols., 1978).

AMK y AFMK se forman durante el metabolismo enzimático de la melatonina en el cerebro (Hirata y cols., 1974), pero también son productos secundarios cuando la melatonina actúa como depurador de radicales libres. Como hemos visto, estos metabolitos son también eficientes antioxidantes (Tan y cols., 2001, 2003), y existen evidencias de su participación en la inhibición de la NOS cerebral (León y cols., 2006).

### **2.5.3 Propiedades antioxidantes de la melatonina**

La acción como potente antioxidante de la melatonina, ha sido de creciente interés en los últimos años. Existen estudios que describen su papel como más poderoso que aquél ejercido por el glutatión, el manitol o la vitamina E, en parte debido a su capacidad para difundir dentro de las células.

En el papel de la melatonina como un potente antioxidante ha resultado particularmente llamativa la alta eficacia de la melatonina como protectora frente a las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Este campo de investigación ha sufrido un enorme empuje en la última década y aunque los mecanismos de acción de la

melatonina no han sido totalmente esclarecidos, no existen dudas en cuanto a su habilidad para restaurar el daño molecular originado por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Se han descrito distintas vías mediante las cuales la melatonina podría ejercer su acción. Así, las evidencias experimentales sostienen una acción directa eliminando radicales libres, así como una acción indirecta, estimulando la actividad de las enzimas antioxidantes, potenciando la síntesis del glutatión, impulsando la actividad de otros antioxidantes e incrementando la eficiencia de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Tengattini y cols., 2008).

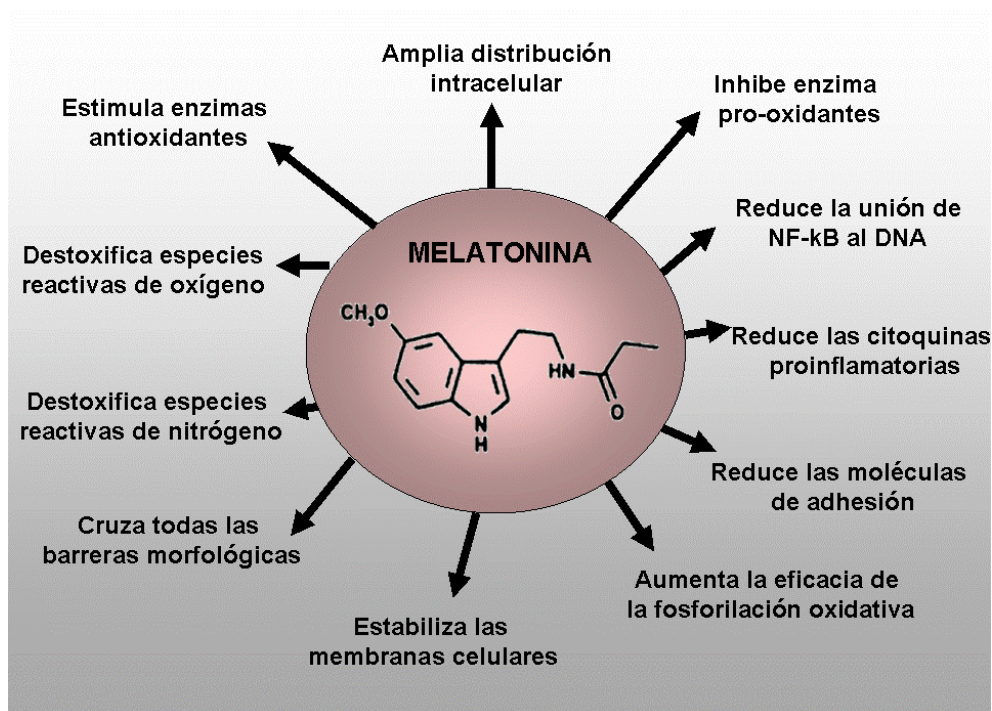
Diversos estudios documentan la capacidad de la melatonina para interaccionar de forma directa con las ERO y ERN. Se sabe pues que cada molécula de melatonina interacciona con dos de  $\cdot\text{OH}$  (radical hidroxilo), como consecuencia de lo cual se genera un producto denominado 3-hidroxi-melatonina. La melatonina también es capaz de interactuar con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), especie reactiva de oxígeno no radical, que se genera *in vivo* por la acción de diversos sistemas enzimáticos y, de forma adicional, en el interior de la célula como resultado de la dismutación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (Tengattini y cols., 2008). La eficacia de la melatonina neutralizando el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ha sido escasamente analizada. Ciertos estudios llevados a cabo en sistemas químicos puros diseñados en el laboratorio parecen mostrar una cierta actividad reparadora de la melatonina ante la formación de este anión. Sin embargo, el papel de la melatonina, eliminando el anión superóxido, no está nada

claro, especialmente en los sistemas vivos (*in vivo*).

El óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) es una molécula que se produce en grandes cantidades en mamíferos y que esta implicada en un gran número de procesos inflamatorios con un extenso daño tisular. Gran parte de la toxicidad de esta molécula radica en su capacidad para acoplarse con el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) lo cual resulta en la formación del anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que es altamente reactivo. Se ha observado que la eficacia neutralizadora de la melatonina depende de la presencia de oxígeno en el medio reactivo, por lo que es muy posible que sea sobre el derivado ONOO<sup>-</sup> sobre el cual ejerza su acción (Tengattini y cols., 2008).

Además de su capacidad para actuar de forma directa neutralizando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la melatonina lleva a cabo acciones indirectas como antioxidante a través de múltiples vías, que contribuyen a minimizar los efectos negativos de una situación de estrés oxidativo.

El conjunto de enzimas antioxidantes constituyen el mayor mecanismo de defensa contra el daño promovido por los radicales libres, metabolizándolos en productos menos tóxicos o carentes de toxicidad. Las enzimas antioxidantes más estudiadas en relación al papel estimulador de la melatonina, son, la superóxido dismutasa (SOD) en sus dos isoformas, mitocondrial (Mn-SOD) y citosólica (Cu,Zn-SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (Tengattini y cols., 2008).



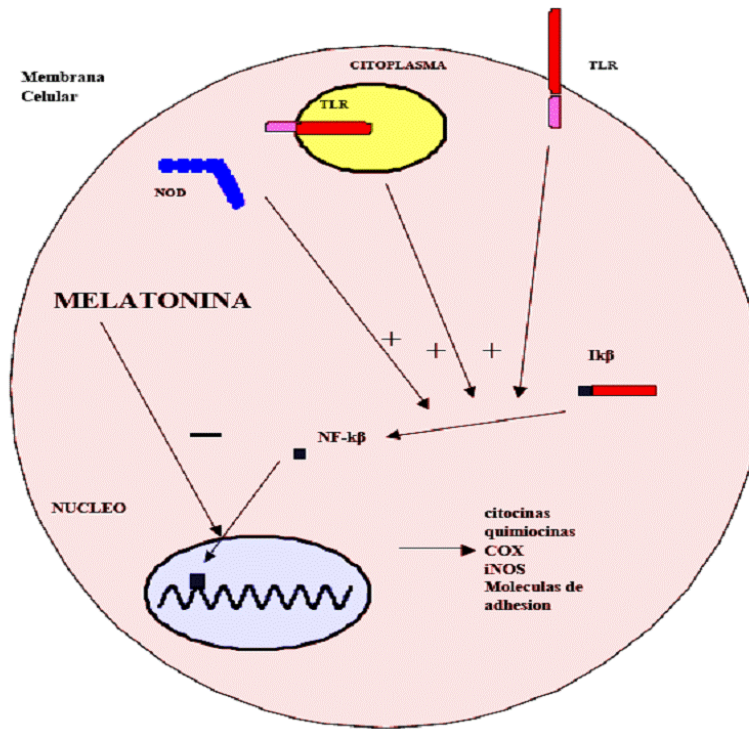
Esquema 5. Funciones de la melatonina. Fuente: Adan y Prat, 2007.

#### 2.5.4 Melatonina e inflamación

La inflamación se inicia cuando las células en el tejido dañado reconocen un estímulo inflamatorio. Estas señales conducen al reclutamiento y activación de las células del sistema inmune. El factor de transcripción NF-κB regula un gran número de genes implicados en la respuesta inmune y en la inflamación, por lo que esta ruta es un probable objetivo para disminuir la inflamación crónica que se produce en diversas enfermedades por ejemplo, la autoinmunidad (Alonso y cols., 2006). El NF-κB es también

importante para la síntesis de las enzimas que generan las prostaglandinas y las especies reactivas de oxígeno (por ejemplo, COX e iNOS), sustancias que también están involucrados en la inflamación (Hayden y cols., 2006). Además, la expresión de las moléculas de adhesión de leucocitos circulantes y endotelio de leucocitos que participan en la migración están también regulados por NF- $\kappa$ B (Alcamao y cols., 2001; Ward y cols., 1999).

La melatonina disminuye la activación del NF- $\kappa$ B y su unión al ADN, probablemente por la prevención de su translocación al núcleo (Chuang y cols., 1996). Su acción reduce la producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas. Además, la melatonina inhibe la expresión de las moléculas de adhesión y suprime la síntesis de las enzimas que generan las prostaglandinas y las especies reactivas de oxígeno (por ejemplo, COX e iNOS) en el hígado, pulmón y riñón de rata. (Sewerynek y cols., 1996; Reiter y cols., 2000; Kireev y cols., 2008; Tengattini y cols., 2008) (esquema 6).



**Esquema 6.** El efecto antiinflamatorio de la melatonina. Fuente: Szecepanik, 2007.

La adaptación cardíaca en respuesta al estrés tanto intrínseco como extrínseco implica un proceso complejo de remodelación de la cámara y modificaciones moleculares en los miocitos (Takimoto y Kass, 2007). En este contexto, se ha demostrado que la administración de ciertos compuestos antioxidantes (ubiquinona, vitamina E) ejerce protección frente a los trastornos oxidativos cardiovasculares (Cao y cols., 2006). La melatonina atenúa los daños moleculares y celulares resultantes de la isquemia/reperfusión cardíaca en la cual de radicales libres se encuentran

involucrados (Tengattini y cols., 2008). Las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes de la melatonina también están involucradas en la protección descrita contra una enfermedad vascular crónica, la aterosclerosis. De esta forma la administración de melatonina, se ha propuesto que reduce la hipertensión y la cardiotoxicidad inducida por algunos fármacos de uso clínico (Kireev y cols., 2008). La necrosis miocárdica se asocia con una activación del complemento y una generación de radicales libres, lo que provoca una regulación a la alza de la casacada de citoquinas y quemoquinas (Esrefoglu y cols., 2005). Salie y cols. (2001) indicaron que la melatonina, a través de la inhibición de la generación de ROS y de la acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, protege a los miocitos de rata de los daños morfológicos ocasionados por la isquemia/reperfusión.





## **3 METODOLOGÍA**



### **3.1 ÁMBITO DE TRABAJO**

Este trabajo de experimentación fue desarrollado en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de León.

### **3.2 ANIMALES**

Para la realización de este trabajo se han utilizado ratas macho de la raza Wistar (Charles River, Barcelona), con un peso comprendido entre 150g y 250g, mantenidas en jaulas con libre acceso al agua y a una dieta estándar.

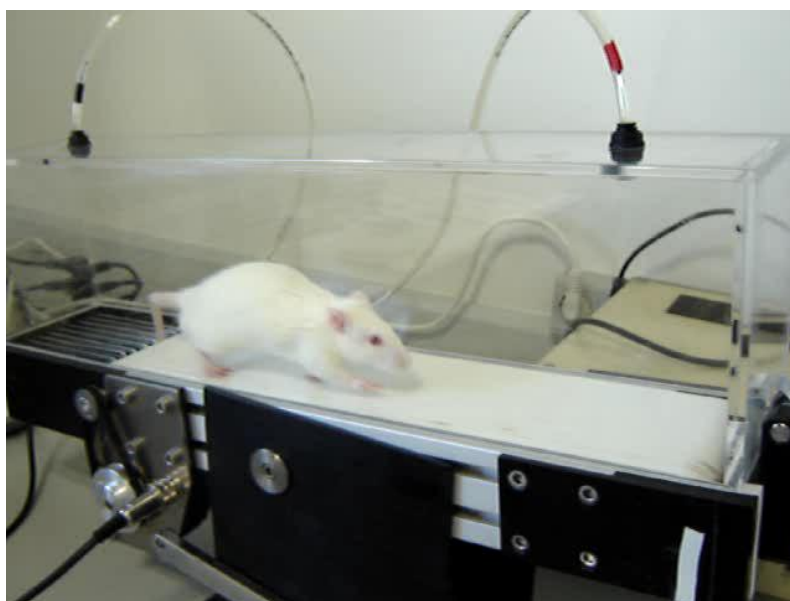
Los animales se mantienen en condiciones controladas de temperatura (22-24°C) y humedad (50-60%), con un fotoperíodo (luz/oscuridad) de 12 horas, desde las 8:00 a las 20:00 horas.

Todos los experimentos con los animales de laboratorio se ejecutan siguiendo las pautas recogidas en la normativa internacional GLP (*Good Laboratory Practices*), en la Directiva Europea 86/609/CEE y en la Legislación Española R.D. 223/86, referentes a la investigación y protección animal.

### **3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El protocolo de ejercicio agudo empleado ha sido previamente descrito por el grupo de Hollander y cols. (2001). Éste consiste en una carrera de una hora de duración sobre un tapiz rodante con un 10% de inclinación sobre la superficie horizontal y una velocidad constante de 25 m/min. Se emplean

dos tipos de tapices rodantes, uno de ellos sencillo (Letica, L18706) y otro conectado a un analizador de gases que permite monitorizar a tiempo real el consumo de gases por parte del animal que ejecuta el ejercicio (Oxylet 4 LE 400-4), diseñado especialmente para trabajar con animales pequeños. Capaz de medir bajas concentraciones de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub> y permite el estudio del metabolismo energético mediante calorimetría indirecta. Los análisis de gases respiratorios (VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, RQ, y EE se llevó a cabo del software MetabolismH (Panlab, SL, Barcelona, España)).



30 minutos antes del desarrollo del ejercicio se administra por vía intraperitoneal, melatonina en unos grupos, a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal disuelta en solución salina 0,9% con etanol al 0,5%, o solución salina 0,9% con etanol al 0,5% en otros grupos, siempre en un

volumen final de 0,5 ml.

### **3.3.1 Grupos experimentales**

Los animales se clasifican en 4 grupos en función del tratamiento experimental a los que se les somete en cada caso:

- ❖ C: animales control que reciben solución salina 0,9% con etanol 0,5% vía intraperitoneal.
- ❖ CM: animales control que reciben melatonina disuelta en solución salina 0,9% con etanol 0,5% vía intraperitoneal.
- ❖ E: animales que ejecutan el protocolo de ejercicio y a los que se administra vía intraperitoneal solución salina 0,9% con etanol 0,5%.
- ❖ EM: animales que ejecutan el protocolo de ejercicio y a los que se administra vía intraperitoneal melatonina disuelta en solución salina 0,9% con etanol 0,5%.

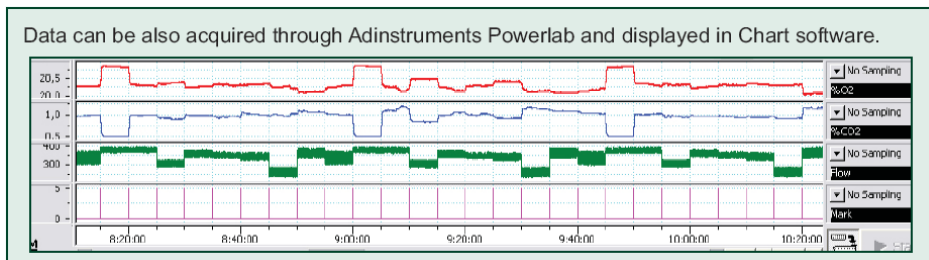
### **3.4 MEDICIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO**

El sistema OXYLET permite estudiar el metabolismo energético a través de calorimetría indirecta en pequeños roedores (ratas, hamsters...). El sistema permite medir el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, obteniendo a su vez el cociente respiratorio. Esta medición permite conocer el metabolismo del animal, su gasto energético y el tipo de substratos utilizados (grasas e hidratos de carbono).

El sistema consta de: unidad de aporte de flujo de aire, analizador de gases con un sensor para cada gas y software para la compilación de valores.

La unidad de flujo de aire aporta un flujo de aire constante que puede ajustarse (desde 150 ml/min hasta sobre 2 l/min). La unidad de analizador de gases mide la concentración de oxígeno y de dióxido de carbono con un sensor específico para cada gas. El sensor de O<sub>2</sub> utiliza un diodo láser (0 a 100%) y el sensor de CO<sub>2</sub> utiliza un sistema de absorción de luz infrarroja (0 a 10%).

Los parámetros medidos se visualizan en la pantalla de la unidad de análisis de gases. El sistema también puede estar conectado a un sistema de adquisición de datos. Los archivos generados pueden ser analizados utilizando el software METABOLISM.



El gasto de energía se calcula mediante la ecuación de Weir:

$$EE = 1,44 \times VO_2 \times (3,815 + 1,23 \times RQ) \text{ kcal/día/kg}$$

### **3.5 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO. RECOGIDA DE MUESTRAS**

El proceso se inicia con el pesado del animal y la posterior anestesia con pentobarbital sódico, vía intraperitoneal, a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal, disuelto en solución salina. Una vez anestesiado, el animal se fija a una placa quirófano, colocándose junto a una lámpara térmica que permita mantener una temperatura constante aproximada de 37°C, con objeto de evitar los efectos negativos de la hipotermia.

La intervención quirúrgica comienza con la disección de la arteria carótida del lado izquierdo, introduciendo en ella un catéter (0,5 x 0,9 mm Braun, Melsungen AG, Alemania) provisto de solución anticoagulante (heparina 0,05% en solución salina al 0,9%) y se procede a la exanguinación del animal a través de dicho catéter.

Posteriormente se recogen el músculo cardíaco que es inmediatamente sumergido en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para su posterior análisis.

### **3.6 SOLUCIONES UTILIZADAS**

#### Melatonina

La melatonina (Sigma Chemical Co, San Luis, USA) se disuelve en 25 µl de etanol absoluto y posteriormente se lleva a un volumen final de 0,5 ml con solución salina al 0,9%. Se estima la cantidad de melatonina para cada animal de modo que la dosis administrada sea de 1 mg/kg peso corporal.

### Pentobarbital

El pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co, San Luis, USA) se disuelve en solución salina fisiológica en una concentración de 5 mg/ml.

### Heparina

Se prepara disolviendo heparina sódica (Rovi, Madrid) en solución salina fisiológica (0,9%) a una concentración final de 0,05%.

### Solución salina fisiológica

Se prepara disolviendo cloruro sódico (Panreac, Madrid) en agua destilada hasta una concentración final de 154 mM.

## **3.7 APARATOS UTILIZADOS**

- ❖ Autoclave: Raypa, modelo Sterilmatic.
- ❖ Balanzas de precisión: Sartorius, modelo R200D; Sartorius, modelo 2842.
- ❖ Baños termostáticos: Selecta, modelo 135925; Selecta, modelo CE95, Selecta, modelo Unitronic 320 OR.
- ❖ Baño ultrasónico: Sonovex, modelo TK-52.
- ❖ Centrífugas: Eppendorf, modelo Centrifuge 5415C, Heraeus Sepatech, modelo Haemofuge A Beckman, modelo Microfuge E Jouan, modelo BR 3.11. Rotor utilizado: S-4 Du pont, modelo Sorvall RC-5B



Superspeed Centrifuge. Rotor utilizado: SS-34, Beckman, modelo XL-100 K Ultracentrifuge. Rotor utilizado: 70.1 Ti.

- ❖ Equipo de fotodocumentación: TDI, modelo Gelprinter plus.
- ❖ Espectrofotómetros: Milton Roy, modelo Spectronic 1201 Hitachi, modelo U-2000.
- ❖ Cubetas de electroforesis vertical: Bio-Rad Mini-PROTEAN<sup>®</sup>3 Cell, Bio-Rad, Miniprotean II cell Bio-Rad, Protean II xi cells.
- ❖ Desecador de geles: BioRad, modelo 583.
- ❖ Aparato de transferencia: Bio-Rad, Trans-blot SD.
- ❖ Fuentes de alimentación: Bio-Rad, modelo 200/2 Savant instruments, modelo HV 1000.
- ❖ Granatario: Sartorius, modelo 1216 MP.
- ❖ Material de cirugía: Agujas, bisturís, cánulas, catéteres, pinzas, suturas, tijeras.
- ❖ Material de laboratorio de carácter general: agitadores de tubos, arcones congeladores, dispensadores automáticos, frigoríficos, micropipetas automáticas, ordenadores, pipetas.
- ❖ pH metros: Crison, modelo 2001 Meteor, modelo 991 A.
- ❖ Homogenizador: Homogenizador electrónico, potters y vástagos

autoclavados.

- ❖ Tapiz rodante: Letica modelo LI8706.
- ❖ Analizador de gases: Oxylet 4 LE 400-4.
- ❖ Expresión génica: Applied Biosystems, modelo ABI 7000 Sequence Detection System.

### **3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.8.1 Determinaciones en sangre**

##### **3.8.1.1 Obtención de plasma sanguíneo**

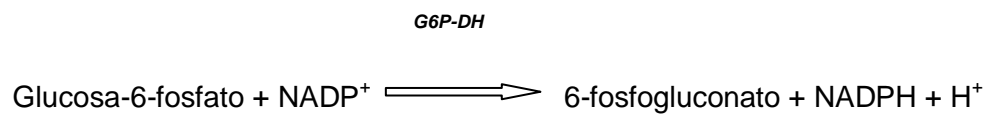
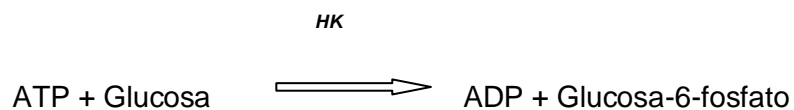
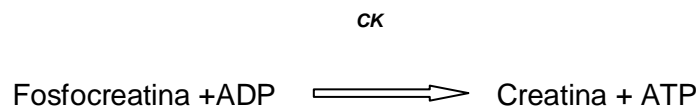
La sangre obtenida por exanguinación de la arteria carótida se somete a una centrifugación suave, a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y siempre a una temperatura de 4°C. Posteriormente se recoge la fracción plasmática y que se almacena a -80°C para su posterior análisis.

##### **3.8.1.2 Determinación de la creatín quinasa (CK) en plasma**

La creatín quinasa (CK) es una enzima intracelular, ampliamente distribuida en los tejidos del organismo. Su función fisiológica está asociada con la generación de ATP por sistemas contráctiles o de transporte. Los niveles elevados de esta enzima se asocian con alteraciones del músculo esquelético y en infartos de miocardio.

### Fundamento

El método de determinación utilizado (Szasz y cols., 1976) se lleva a cabo, previa activación de la enzima mediante N-acetilcisteína, de acuerdo con las siguientes reacciones acopladas:



La formación de NADPH es proporcional a la cantidad de enzima presente en el medio.

### Reactivos

- ❖ Reactivo A: Imidazol (pH 7,0), glucosa, acetato de magnesio EDTA.
- ❖ Reactivo B: ADP, AMP, di-Adenosina-5-pentafosfato, NADP<sup>+</sup>, hexoquinasa (HK), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6F-DH), N-acetilcisteína, fosfato de creatina.

### Método

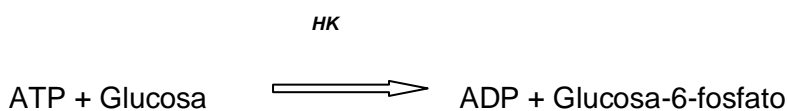
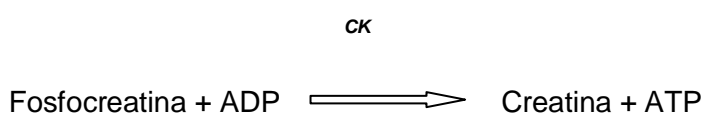
Se utilizó un kit comercial (Spinreact). Se incubó 1 ml de esta solución reactiva junto con 40µl de plasma durante 2 minutos. Se lee la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Se calcula el cambio de absorbancia media por minuto.

#### **3.8.1.3 Determinación de la creatín quinasa-MB (CK-MB) en plasma**

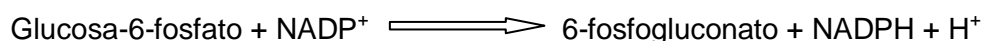
La CK-MB es una enzima compuesta de dos subunidades, la subunidad M expresada en el músculo y la subunidad B, expresada en las células nerviosas. La CK-MB se encuentra en el suero en concentraciones bajas, se incrementa como consecuencia de un infarto de miocardio y después desciende a niveles normales. Puede incrementarse, más raramente, en traumatismos del músculo esquelético.

### Fundamento

El anticuerpo anti CK-M inhibe completamente la actividad de la CK-MM y la subunidad (M) de la CK-MB. La actividad de la CK-B no inhibida se determina según las siguientes reacciones:



*G6P-DH*



La velocidad de formación de NADPH, determinado espectro fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de CK-MB en la muestra ensayada (Abbot y cols., 1984; Gerhardt y cols., 1979).

Reactivos

- ❖ Reactivo A: Imidazol (pH 6,7), Glucosa, Acetato de magnesio EDTA.
- ❖ Reactivo B: Anti CK-M, ADP, AMP, di-adenosina-5-pentafosfato, NADP<sup>+</sup>, hexoquinasa (HK), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6F-DH), N-acetilcisteína, fosfato de creatina.

Método

Se utilizó un kit comercial (Spinreact). Se incubó 1 ml de esta solución reactiva junto con 40µl de plasma durante 10 minutos. Se lee la absorbancia a 340 nm (A1) inicial de la muestra y de nuevo a los 5 minutos (A2). Se calcula la diferencia de absorbancias:

$$A = A2 - A1$$

**3.8.2 Determinaciones en músculo cardíaco**

**3.8.2.1 Obtención de homogeneizado fresco**

Se homogeneizan 100 mg de músculo cardíaco en 1 ml de tampón de

homogeneización (tris 10 mM, sacarosa 0,25 M, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, fosfato sódico 30 mM, NaF 50 mM, ortovanadato sódico 30 mM (pH 7,4)). El músculo se trocea previamente para facilitar su completa homogeneización que se lleva a cabo en potters en el homogeneizador.

### **3.8.2.2 Obtención de la fracción citosólica**

Para la obtención de la fracción citosólica las muestras se homogeneizan tal y como se describe en el apartado anterior, con una posterior centrifugación a 14000 r.p.m. durante media hora y a 4°C. El sobrenadante que resulta de dicha centrifugación es recolectado y almacenado a -80°C hasta la realización de las determinaciones analíticas.

### **3.8.2.3 Obtención de extractos nucleares**

#### Fundamento

La extracción nuclear se lleva a cabo mediante lisis celular y posteriores centrifugaciones.

#### Reactivos

- ❖ Reactivo A: 10 mM hepes NaOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF.
- ❖ Reactivo B: 20 mM Hepes-NaOH (pH 7,9), 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM EDTA (pH 8), 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF.
- ❖ Nonidet.

### Método

Para la obtención de los extractos nucleares de músculo cardíaco se homogeneizan 50 mg de tejido en 2 ml de tampón A con un 0,1% de Nonidet, utilizando potters y vástagos autoclavados. Tras 15-60 minutos de incubación en hielo se centrifugan las muestras 10 minutos a 1000 r.p.m. a 4°C y se descarta el sobrenadante resultante. El pellet se resuspende nuevamente en 2 ml de tampón A sin detergente, se agita vigorosamente en vórtex y se centrifuga 10 minutos a 1000 r.p.m. a 4°C. Al pellet resultante se le añaden 50 µl de tampón. Posteriormente se incuba en hielo durante 30 minutos y se centrifuga a 4°C durante 15-30 minutos a 14000 r.p.m. para recoger el sobrenadante que se almacena a -80°C hasta su posterior análisis.

#### **3.8.2.4 Concentración de proteínas**

##### Fundamento

La unión de las proteínas con el reactivo de Bradford produce un cambio en el color del reactivo, y por tanto un cambio en su absorbancia. El reactivo Bradford contiene ácido fosfórico, metanol y también azul de comassie que al unirse a los residuos aminoacídicos de proteínas y en especial de arginina, cambia su máximo de absorbancia de 465 a 595 nm.

##### Reactivos

- ❖ Agua Bidestilada.

- ❖ Bradford Reagent (Biorad®).
- ❖ Homogenado de tejido.
- ❖ BSA (albumina de suero bovino): Para realizar la recta patrón.

#### Procedimiento

Se realiza una recta patrón de BSA, para posteriormente interpolar nuestras muestras de concentración desconocida. Se mezclan 800 µl de H<sub>2</sub>O con 200 µl de Bradford. Se lee la absorbancia a 595 nm de cada microcubeta para hacer el blanco.

Después se le añade 2 µl de muestra o patrón, según corresponda en cada microcubeta y se lee la absorbancia a 595nm. Ésta debe haber aumentado gracias a la unión del Bradford con las proteínas que contiene la muestra y la recta patrón.

#### Cálculos

Los cálculos consisten en realizar una recta patrón de concentración conocida de proteínas realizada con BSA e interpolar.

### **3.8.2.5 Actividad de la mieloperoxidasa (MPO)**

#### Fundamento

Para la determinación de la mieloperoxidasa se sigue el método descrito por Bradley y cols. (1982).



La enzima mieloperoxidasa (MPO) se encuentra localizada en los granos azurófilos de los leucocitos, por lo cual es un índice de la actividad de los neutrófilos.

### Reactivos

- ❖ Bromuro de hexadeciltetrametilamonio (HTAB) 0,5%.
- ❖ Tampón potasio 50 mM (pH 6,0).
- ❖ Diclorhidrato de o-dianisina 20 mg/ml.
- ❖ Peróxido de hidrógeno (0,0005% p/v).

### Procedimiento

Se homogeniza la muestra del músculo cardíaco con el Polytron en el tampón de homogenización (Tampón fosfato 50 mM, pH 6,0) conteniendo 0,5% HTBA (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Seguidamente el homogenizado es sonificado durante 10 segundos en hielo (Heat Systems Ultrasonics, Plainview, N.Y.) y se somete a un triple proceso de congelación-descongelación, procesos que facilitan la ruptura de estructuras celulares, favoreciendo también de este modo la liberación de la enzima. Tras la última descongelación la sonicación se repite. Se centrifuga el homogenizado durante 15 minutos a 40000 r.p.m. y se procede a la determinación de la actividad MPO.

Se utiliza 0,1 ml del sobrenadante que se mezcla con 2,9 ml de buffer potásico 50 mM que contiene 0,167 mg/ml de dihidrocloruro o-dianisidina (Sigma) y 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mallinckrodt, Inc., Paris, France). Se lee la absorbancia en un espectrofotómetro U-2000 (Hitachi, Tokio, Japón) a 460 nm.

#### Cálculo

La actividad MPO se expresa como incremento de absorbancia/min/mg proteína.

#### **3.7.2.6 Cuantificación de las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$ , iNOS, ICAM-1 y COX-2 por *Western Blot***

##### Fundamento

La determinación de las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$ , iNOS, ICAM-1 y COX-2 se lleva a cabo mediante la técnica de *Western blot* utilizando el sistema de Laemmli (1970).

##### Reactivos

- ❖ Tampón de lisis: NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%; tris 20 mM, pH 8.
- ❖ Mezcla de inhibidores de proteasas: PMSF, aprotinina e inhibidor de tripsina.
- ❖ Solución de ebullición: H<sub>2</sub>O, tris/HCl 2 M, glicerol 60%, SDS 10%,

pironina 0,5%.

- ❖ Tampón de electroforesis: tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM pH 8,8.
- ❖ Tampón de transferencia: tris 25 mM, glicina 0,2 M y metanol 20%.
- ❖ PBS: NaCl 0,14 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM,  $\text{NaHPO}_4$  8 mM, KCl 2,7 mM.
- ❖ PBS-Tween 0,05%.
- ❖ Solución de bloqueo y se incubación de anticuerpos: 4% y 3% de leche en polvo desnatada en PBS-Tween 0,05%, respectivamente.

### Método

En primer lugar se realiza la homogeneización de 100 mg de músculo cardíaco en 1 ml de tampón de homogeneización (ver apartado 3.7.2.1 Obtención de homogeneizado fresco). El homogeneizado se incuba durante 30 minutos a 4°C y se centrifuga durante 30 minutos a 13000 r.p.m. y 4°C, recogándose a continuación el sobrenadante.

Posteriormente se toma una cantidad de muestra equivalente a 20-75 µg de proteína a la que se le añade tampón de lisis y se incuba durante 2 minutos a 100°C. A continuación se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 9-14% en tampón de electroforesis. Para la realización del gel se prepara la siguiente mezcla:

- ❖ 3 ml de mezcla acrilamida/bisacrilamida.

- ❖ 4,75 ml de tampón tris/HCl 0,75 M pH 8,8.
- ❖ 0,5 ml de SDS al 2%.
- ❖ 0,43 ml de persulfato amónico al 1%.
- ❖ 0,3 ml de TEMED al 1%.
- ❖ 1 ml de H<sub>2</sub>O milliQ.

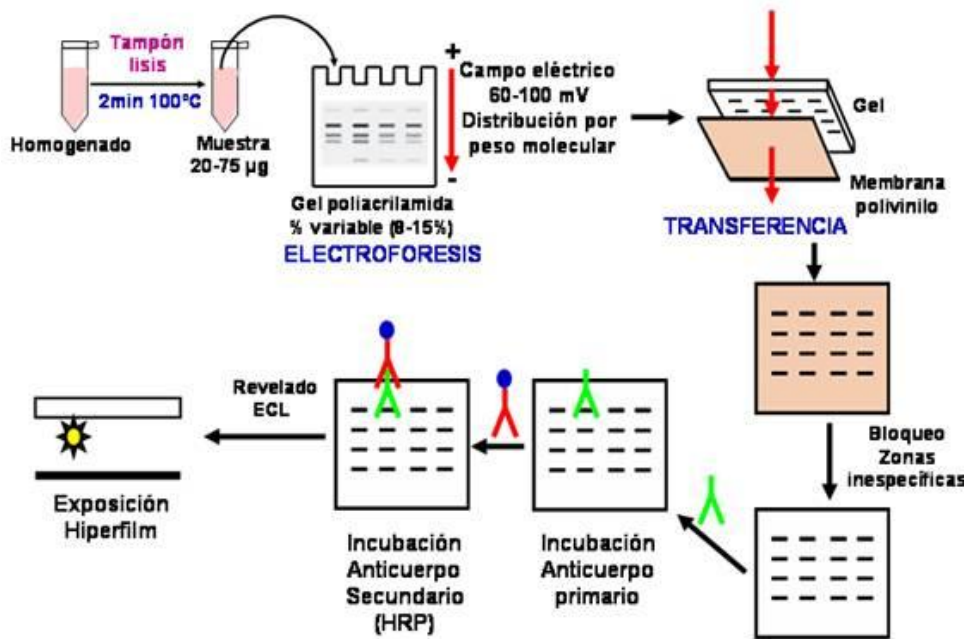
Una vez separadas, las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa para permitir su exposición a los anticuerpos. Para dicha transferencia, una vez extraído el gel, éste se equilibra en un tampón de transferencia. La transferencia se realiza a 13 V durante 20-25 minutos. Para comprobar que la transferencia es correcta se introduce la membrana de nitrocelulosa en una solución de rojo Ponceau para visualizar las proteínas totales. La membrana se lava en agitación durante 5 minutos con agua y durante otros 5 minutos con PBS. Después se incuba durante media hora en solución de bloqueo (4% leche en polvo desnatada en PBS-Tween frío) a 37°C.

A continuación la membrana se incuba durante una noche con anticuerpos específicos para la I $\kappa$ B $\alpha$  (41kDa), IKK $\alpha$  (85kDa), iNOS (130 kDa), ICAM-1 (95 kDa) y COX-2 (70 kDa) de rata obtenidos en conejo y en ratón (Cell Signaling Technology, Beverly, USA; Biomol Internacional, Plymouth Meeting, PA; Abcam, Cambridge, UK). Transcurrido ese tiempo se lava 5 veces con PBS-Tween. Posteriormente se incuba durante 1 hora y media con un anticuerpo antiinmunoglobulina de conejo o de ratón unido a HRP

(DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Transcurrido el tiempo se vuelve a lavar 5 veces en PBS-Tween.

La detección de las proteínas se realiza por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Gran Bretaña) exponiendo la membrana durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente se introduce en una cassette hermética junto con una película (Amersham Hyperfilm ECL, Gran Bretaña), durante aproximadamente 1 minuto.

Tras el revelado y secado de la película se lleva a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando para ello el programa Scion Image 4.02 para Windows (Scion Corporation, Frederick, USA).



Esquema 7. Esquema de la técnica del *Western-blot*

### 3.8.2.7 Retrotranscripción-Amplificación cuantitativa del ARN (*RT-PCR* en tiempo real)

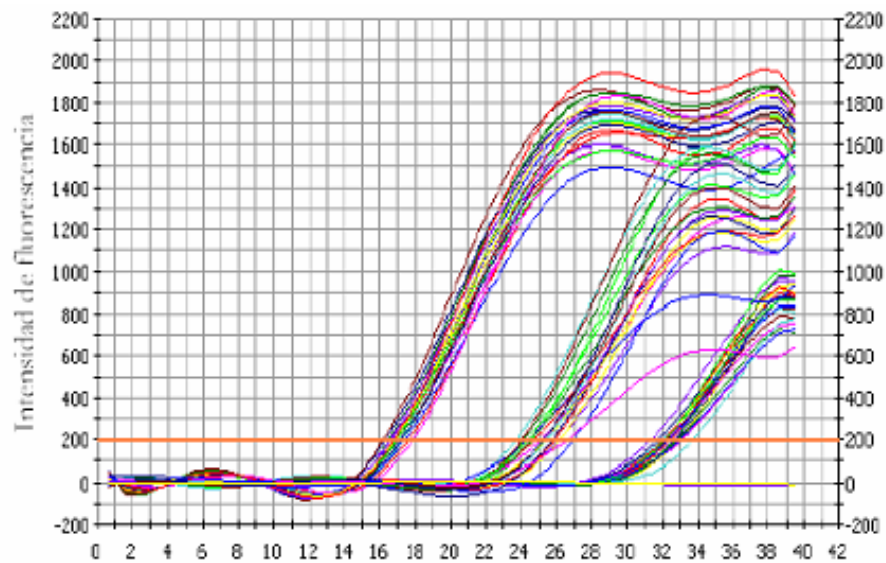
#### Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (*RT-PCR*) es actualmente el método más sensible y exacto para la detección de niveles de ARN mensajeros (ARNm), tanto en células como en tejidos.

Este método, a diferencia del semicuantitativo, permite la detección directa

del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes que sólo emiten fluorescencia cuando el ADN está en forma de doble cadena, de modo que determinando el incremento de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado.

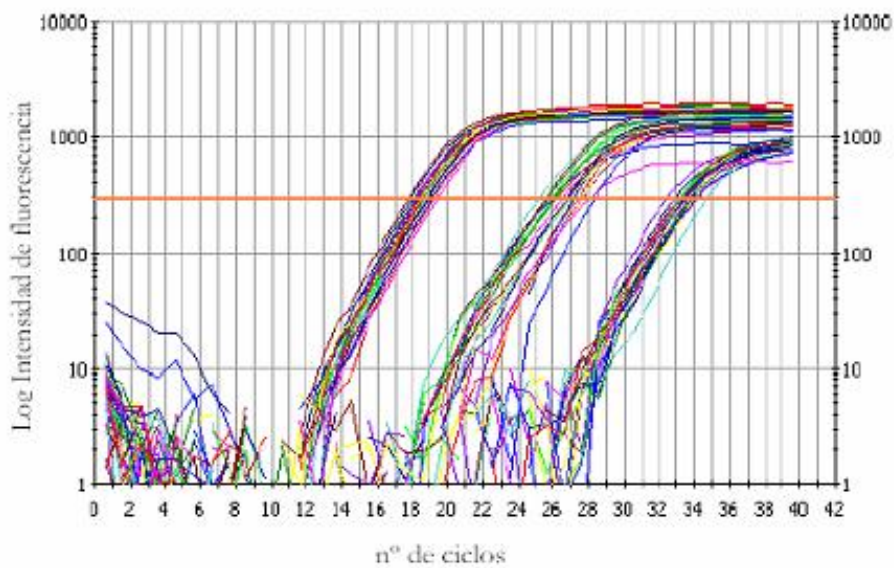
Así, este método nos permite seguir la reacción a medida que transcurre a través del incremento de fluorescencia, y nos permite controlar la reacción en todo momento (aumento del nº de ciclos, repetición de ciclos, pausa...).



**Esquema 8.** Representación de la amplificación en la *RT-PCR*.

El software del ordenador construye estas curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en

tiempo real. Así, al final obtenemos una representación en la que el eje de ordenadas es la fluorescencia y el eje de abscisas es el nº de ciclos transcurridos. Una vez obtenida la representación, el eje de ordenadas se transforma en logarítmico para su mejor interpretación (esquema 8 y 9).



**Esquema 9.** Curva de amplificación tras transformar el eje de ordenadas en logarítmico

En el caso de la PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (“threshold cycle”, Ct), pues es a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de cADN



(ADN copia) de partida, puesto que cuanto más copias de ARNm (ARN mensajero) de partida del gen estudiado haya, más cADN se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de ARNm de partida conocidas, este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión de un gen de expresión constitutiva, es decir, que no varía según diferentes condiciones. La cuantificación absoluta supone el conocimiento del número exacto de copias de ARNm de partida empleado para la realización de la curva estándar.

Otro método para determinar la expresión a partir de las curvas de amplificación obtenidas consiste en la comparación de Ct. Como hemos señalado, cuanto más ARNm de partida haya, menor es el Ct obtenido.

Este método se asemeja al método de la curva estándar, pero utiliza fórmulas aritméticas cuya resolución conduce a la cuantificación relativa de la expresión de un determinado gen.

#### Reactivos

- ❖ SV Total RNA Isolation System (Promega, Inc., Madison, WI).
- ❖ High-Capacity cADN Archive (Applied Biosystems, (Applied Biosystems, Foster City, CA).
- ❖ LC Fast Start DNA SYBR Green (Roche Applied Science).

- ❖ TaqMan Universal PCR Master (Applied Biosystems).

### Método

Para la expresión de los genes de iNOS, ICAM-1, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 se utiliza la técnica estandar *RT-PCR* y co-amplificada con el gen referencia HPRT, el cual se utiliza como control interno. Las muestras ARN total del músculo cardíaco son aisladas utilizando el kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Inc., Madison, WI) y después revertido en cADN. Primeramente el cADN fue sintetizado utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, (Applied Biosystems, Foster City, CA). El resultado del cADN fue amplificado utilizando el kit LC Fast Start DNA SYBR Green (Roche Applied Science) para los genes iNOS y HPRT y el mix TaqMan Universal PCR Master (Applied Biosystems) para los genes ICAM-1, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y HPRT, en el aparato ABI 7000 (Applied Biosystems) (García-Mediavilla y cols., 2007).

Los primers SYBR Green para la iNOS se utilizo las secuencias (F:CCAGGTGCACACAGGCTACTC;R:GCTCTTTCTGCAGGATGTCTTGA) y para el gen HPRT (F:CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC;R:GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGC) todos de la casa comercial TIBMOLBIOL (Berlin, Germany). Los primers TaqMan para ICAM-1 (Gen D00913.1 y RN00564227\_m1), COX-2 (Gen U03389.1 y RN00568225\_m1), TNF- $\alpha$  (Gen AJ002278.1 y RN99999017\_m1), IL-1 $\beta$  (Gen M98820.1 y RN99999009\_m1), IL-6 (Gen M26744.1 y RN99999011\_m1) y el gen HPRT (Gen X03205.1 y RN01527840\_m1)

todos de la casa comercial TaqMan1 Assayson-Demand Gene (Applied Biosystems) (Crespo y cols., 2008).

### Cálculos

En la presente tesis realizamos una cuantificación relativa del gen problema, utilizando el método de comparación de Ct. La ecuación que permite la cuantificación por este método viene dada por:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

donde  $\Delta Ct = \Delta.Ct1 - \Delta.Ct2$

siendo  $\Delta Ct1 = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia de la muestra 1}$

$\Delta Ct2 = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia de la muestra 2}$

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. La comprobación de este requisito se realiza comparando curvas estándar de cantidades de ARN conocidas para cada uno de los genes, el problema y el de referencia. Una vez obtenidas las curvas de amplificación se representa el logaritmo de la concentración frente al Ct, tanto para el gen problema como para el de referencia, y se calcula la pendiente de la recta para cada una de las representaciones obtenidas.

Para que las eficiencias sean similares, las pendientes de ambas rectas

deben ser similares, puesto que la eficiencia de la reacción de amplificación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Para una pendiente de  $-3,322$  obtenemos una eficiencia del 100%, lo cual significa que el aumento de un ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción supone exactamente la duplicación del material amplificado.

Una reacción de amplificación debe tener una eficiencia lo más cercana al 100% para estar optimizada.

Una vez comprobamos que las eficiencias son comparables, realizamos las reacciones de amplificación conjuntamente para ambos genes (problema y referencia) y para cada muestra: control, control/melatonina, ejercicio, ejercicio/melatonina por duplicado.

### **3.8.2.8 Determinación de la activación del factor NF- $\kappa$ B**

#### Fundamento

La activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B se realiza por el método descrito por Roman y cols. (1999), que consiste en la separación electroforética del complejo formado por el NF- $\kappa$ B y una sonda específica de ADN marcada radiactivamente.

### Método

#### 1) Marcaje de la sonda específica:

Se utiliza un oligonucleótido con la secuencia consenso para el NF- $\kappa$ B 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGCC-3' (Promega, Madison, USA) marcado con  $^{32}\text{P}$ , para lo cual se dispone en un tubo eppendorf a 4°C de la siguiente mezcla reactiva:

- ❖ 9,5  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril.
- ❖ 5,7  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido para NF- $\kappa$ B.
- ❖ 2,5  $\mu\text{l}$  de tampón 10x T4 PNK.
- ❖ 5,3  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{mol}$ )  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$  (ATP).
- ❖ 2  $\mu\text{l}$  de la enzima T4 PNK.

Tras agitar esta mezcla, se incuba a 37°C durante 30 minutos, posteriormente y con el fin de detener la reacción y purificar el oligonucleótido, se añaden:

- ❖ 2,5  $\mu\text{l}$  de EDTA sódico 0,1 M.
- ❖ 12,5  $\mu\text{l}$  de acetato de amonio 3 M.
- ❖ 80  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto.

Se incuba a -20°C durante 30 minutos pasados los cuales se centrifuga a

12000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 500 µl de etanol al 70%. Se incuba de nuevo durante 20 minutos a -20°C y se vuelve a centrifugar durante 15 minutos a 12000 r.p.m. y 4°C. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el precipitado en tampón TE (10 mM tris/HCl y 1 mM EDTA pH 8). La sonda en estas condiciones se almacena a -20°C durante un período inferior a 15 días.

## 2) Reacción de unión con el ADN:

Se prepara la siguiente mezcla reactiva:

- ❖ 5 µl de tampón de incubación (10 mM tris/HCl (pH 7,5), 40 mM NaCl, 1mM EDTA y glicerol 4%).
- ❖ 1 µl de Poli (dl-dC).
- ❖ 13 µg proteína correspondientes a los extractos nucleares de cada muestra.
- ❖ H<sub>2</sub>O estéril hasta completar un volumen final de 25 µl.

Después de 15 minutos en hielo se añaden 2 µl del oligonucleótido marcado (aproximadamente 30000 r.p.m.) y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos.

## 3) Separación electroforética:

Se montan los cristales (limpios de impurezas) y la siguiente mezcla se

vierte en el soporte con el fin de elaborar el gel electroforético:

- ❖ 4 ml de acrilamida/bisacrilamida (29:1).
- ❖ 0,5 M pH 8.
- ❖ 15 ml de H<sub>2</sub>O.
- ❖ 200 µl de persulfato amónico.
- ❖ 10 µl de TEMED.

Una vez añadida la mezcla entre los cristales se coloca un peine con el fin de conformar los 12 pocillos una vez polimerizado el gel, donde colocamos las muestras.

Posteriormente se introducen los cristales en la cubeta de electroforesis cargando ésta con TBE 0,25x. Se añaden 2 µl de azul de bromofenol a las mezclas reactivas con cada una de las muestras y éstas se cargan en el gel utilizando para ello una punta de carga destinada a tal fin. La electroforesis se realiza a 150 V y 4°C durante unas dos horas.

Una vez finalizada la electroforesis, se sustrae el gel cuidadosamente de entre los cristales, se deposita en un papel tipo Whatman® cubriendo la otra cara del gel con film transparente. Con el fin de facilitar la manipulación posterior del gel, este se deseca al vacío y con calor seco (80°C) en un desecador de geles. El gel desecado se introduce en el interior de una cassette hermética con el objeto de exponerlo con una

película de alta sensibilidad (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA) y se incubó a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 7 días. Tras el revelado de la película se realiza la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando el programa Scion Image.

### **3.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

Las variables cuantitativas se expresan mediante el valor de su media y el error estándar de dicha media (E.E.M.). Para el análisis estadístico de los resultados se realiza el test de análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente y en aquellos grupos en los que aparecen diferencias significativas se realiza el test de Newman-Keuls. Este test tipo post-hoc determina la existencia de diferencias significativas entre medias de grupos distintos mediante ANOVA. Todo el tratamiento estadístico de los datos se realiza con el programa SPSS v.13.0 (Chicago, IL) para Windows.



## **4 RESULTADOS**



#### 4.1 PESO CORPORAL Y PESO CARDÍACO EN LOS DISTINTOS GRUPOS EXPERIMENTALES

##### Peso corporal

En la tabla que aparece a continuación (tabla 1) se muestran los pesos medios para cada grupo en el día del experimento y el peso del músculo cardíaco recogido. Los resultados mostrados en la tabla 1 no presentan diferencias significativas en los distintos grupos.

Grupos	Peso (g) día experimento	Peso músculo cardíaco (g)
C	220,5 ±0,2	1,02 ±0,2
CM	226,2 ±4,2	1,01 ±0,2
E	237,8 ±2,8	0,93 ±0,1
EM	242,3 ±3,2	0,99 ±0,1

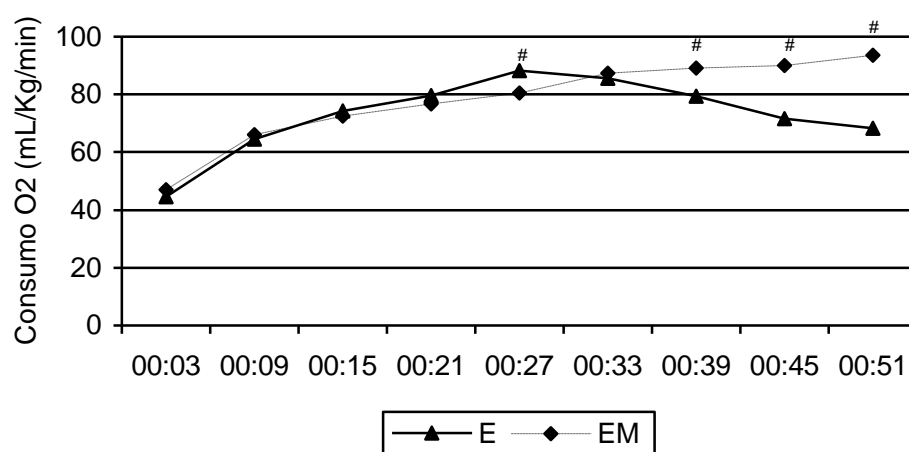
**Tabla 1.** Peso corporal y peso del músculo cardíaco en el día del experimento. Valores medios ± E.E.M de 8 ratas.

## 4.2 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE PARÁMETROS METABÓLICOS

En las tablas que aparecen a continuación se exponen el consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> (tabla 2), así como dos parámetros derivados de la monitorización del consumo de oxígeno y la producción dióxido de carbono - el cociente respiratorio (RQ) y el consumo energético (EE) (tabla 3) - en los grupos de ejercicio que recibieron tratamientos diferentes y para el intervalo de tiempo en el que se ejecutó la carrera. Las medidas se tomaron cada 3 minutos.

Grupos Tiempo (min)	Consumo O <sub>2</sub> (mL/Kg/min)		Producción CO <sub>2</sub> (mL/Kg/min)	
	E	EM	E	EM
0:03	44,5±1,1	47,1±1,7	32,30±1,2	37,53±1,6#
0:09	64,6±0,1	66,1±1,1	46,70±1,7	52,35±1,2#
0:15	74,2±1,2	72,4±2,1	52,75±2,2	56,97±2,1
0:21	79,5±2,9	76,7±1,9	55,88±2,4	60,66±0,8#
0:27	88,2±3,4	80,5±2,2#	62,18±1,1	64,56±1,4
0:33	85,6±0,2	87,4±2,6	61,11±1,3	68,08±1,3#
0:39	79,3±4,8	89,1±3,8#	58,20±2,3	69,67±2,7#
0:45	71,7±7,8	90,1±4,1#	59,00±0,9	69,64±1,4#
0:51	68,4±9,8	93,5±4,6#	56,22±1,1	72,18±2,2#

**Tabla 2.** Consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> durante la carrera para los grupos de ejercicio y ejercicio/melatonina. Valores medios ± E.E.M. de 8 ratas. #p<0,05 respecto ejercicio (E).



**Figura 1.** Efectos del ejercicio y melatonina en el consumo de O<sub>2</sub> (mL/Kg/min). Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. # $p < 0,05$  respecto ejercicio (E).

Como se observa, aquellos animales que recibieron melatonina 30 minutos previo al comienzo del protocolo de ejercicio presentaron un consumo de oxígeno similar en las primeras fases, sin embargo al finalizar el ejercicio tanto el consumo de oxígeno como la producción de dióxido de carbono fueron significativamente diferentes respecto a los animales que no recibieron la melatonina.

En la tabla 3 se recogen los cambios significativos respecto al cociente respiratorio y el gasto energético en ambos grupos experimentales. En el grupo EM el cociente respiratorio se mantuvo constante durante los 53 minutos de monitorización mostrando diferencias significativas respecto al grupo E.

Grupos Tiempo (min)	Cociente Respiratorio (RQ)		Consumo Energético (EE) (Kcal/día/kg)	
	E	EM	E	EM
0:03	0,726±0,05	0,797±0,16#	509,3±11,5	526,9±17,3
0:09	0,723±0,06	0,792±0,16#	740,9±17,8	739,6±15,7
0:15	0,711±0,06	0,787±0,17#	852,3±10,1	807,5±26,0
0:21	0,703±0,06	0,791±0,17#	913,3±15,4	855,3±31,4
0:27	0,705±0,06	0,802±0,17#	1012,1±18,1	893,1±32,9
0:33	0,714±0,07	0,779±0,16#	984,1±23,7	977,6±27,9
0:39	0,734±0,08	0,782±0,16#	914,4±29,1	994,1±16,7
0:45	0,823±0,12	0,773±0,16#	810,2±12,3	1007,8±12,3#
0:51	0,822±0,12	0,772±0,16#	779,8±14,4	1046,7±19,8#

**Tabla 3.** Cociente respiratorio y consumo energético durante la carrera para los grupos de ejercicio y ejercicio/melatonina. Valores medios ± E.E.M. de 8 ratas. . #p<0,05 respecto ejercicio (E).

#### **4.3 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR: CREATÍN QUINASA TOTAL (CK), CREATÍN QUINASA CARDÍACA (CK-MB) Y MIELOPEROXIDASA (MPO)**

##### **Actividad creatín quinasa total (CK) y creatín quinasa cardíaca (CK-MB)**

Con el fin de cuantificar el daño ocasionado tras la ejecución del ejercicio intenso, se determina la actividad de la enzima CK y CK-MB en plasma. El protocolo de ejercicio manifiesta un incremento de la actividad de CK

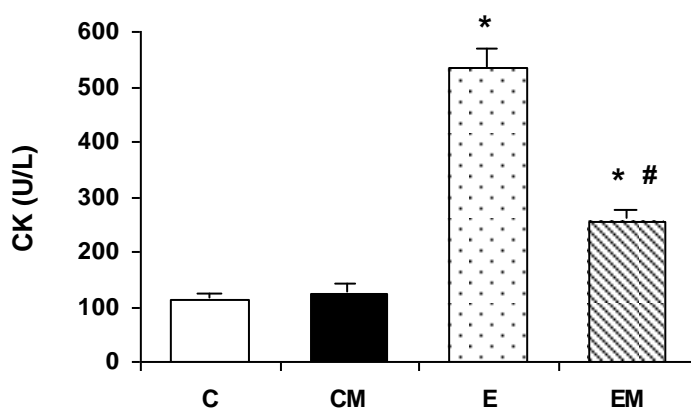
(370% respecto a los controles) y CK-MB (92% respecto a los controles) en los grupos de ejercicio tras 2 horas de finalizado el mismo. Los grupos de ejercicio que reciben una dosis de melatonina, presenta unos incrementos significativamente más bajos respecto al grupo de ejercicio (CK +124% y CK-MB +40%) (tabla 4) (figura 2 y 3).

### Mieloperoxidasa (MPO)

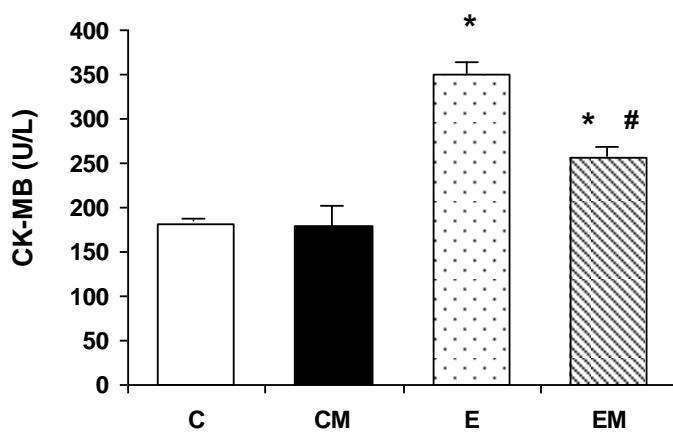
Los valores de la actividad de la MPO en el músculo cardíaco se muestra incrementada tras 2 horas de ejercicio (155%) en relación a los animales controles. Mientras presenta niveles más bajos en el grupo de ejercicio que recibe una dosis de melatonina (EM) respecto al grupo ejercicio E (tabla 4) (figura 4).

	C	CM	E	EM
<b>CK (U/L)</b>	113,5 ± 14,4	123,8 ± 28,9	533,4 ± 59,3*	254,5 ± 58,6*#
<b>CK-MB (U/L)</b>	181,6 ± 1,6	179,1 ± 30,5	349,5 ± 22,2*	255,4 ± 12,7*#
<b>MPO (abs/min/mg proteína)</b>	9,667 ± 0,22	7,968 ± 0,24	24,63 ± 0,24*	10,81 ± 0,13#

**Tabla 4.** Efectos del ejercicio y melatonina en las actividades CK y CK-MB plasmática y en la MPO en el músculo cardíaco. Valores medios ± E.E.M. de 8 ratas. \*p<0,05 respecto a control (C), #p<0,05 respecto ejercicio (E).

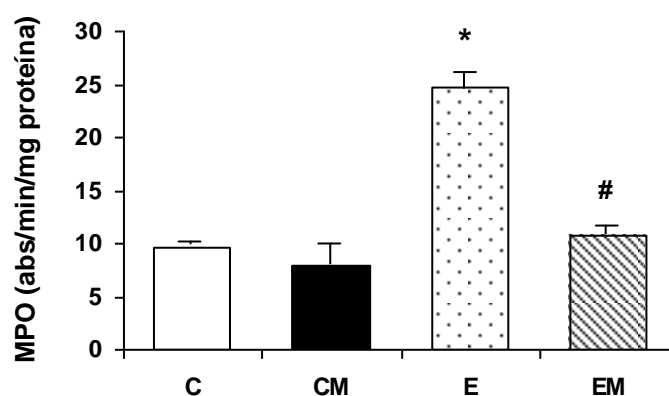


**Figura 2.** Efectos del ejercicio y melatonina en la CK plasmática. Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p < 0,05$  respecto a control (C), # $p < 0,05$  respecto ejercicio (E).



**Figura 3.** Efectos del ejercicio y melatonina en la CK-MB plasmática. Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p < 0,05$  respecto a control (C), # $p < 0,05$  respecto ejercicio (E).

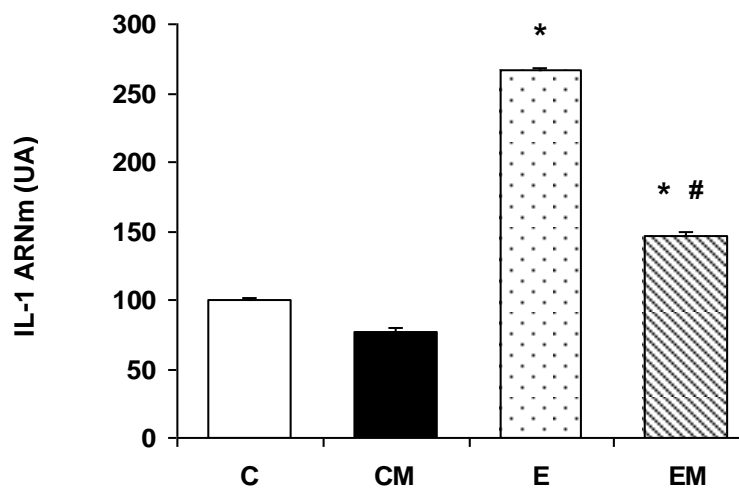
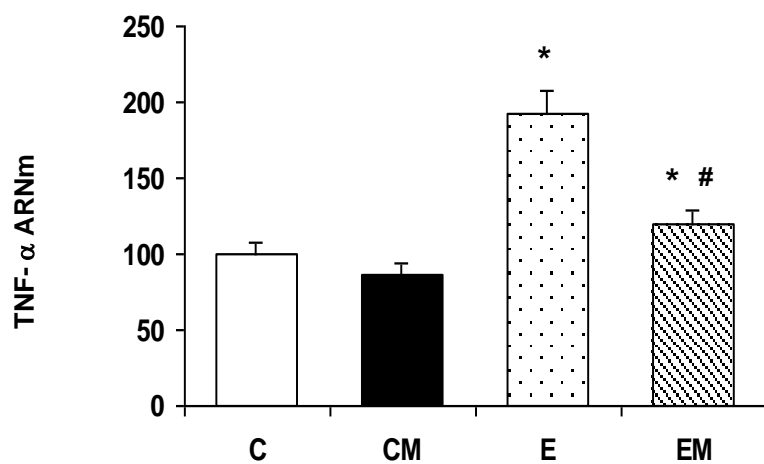


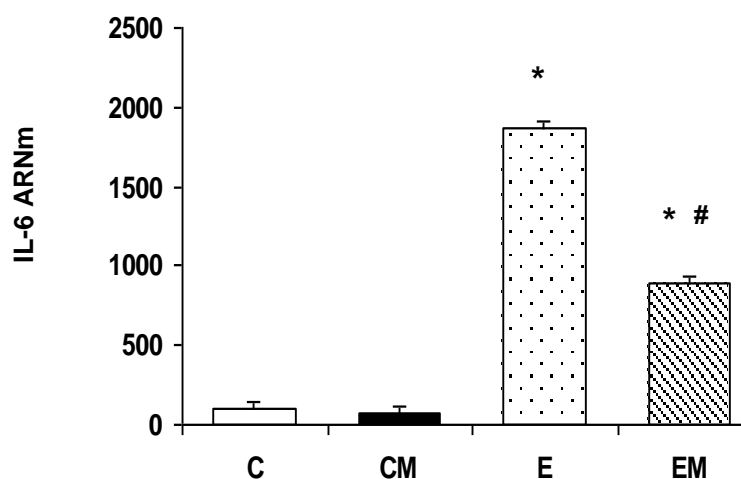


**Figura 4.** Efectos del ejercicio y melatonina en la actividad de la MPO en el músculo cardíaco. Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p < 0,05$  respecto a control (C), # $p < 0,05$  respecto ejercicio (E).

#### 4.4 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LAS CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN EL MÚSCULO CARDÍACO.

La figura 5 muestra los efectos del ejercicio y de la administración de melatonina sobre la expresión de las citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 en el músculo cardíaco, analizados a través de *RT-PCR*. El ejercicio provoca un aumento significativo en los niveles de ARNm para las tres citoquinas TNF- $\alpha$  (92%), IL-1 (166%) e IL-6 (1761%) respecto al grupo control, que fue especialmente observada en la citoquina IL-6. Estos efectos son significativamente reducidos por la administración de melatonina.





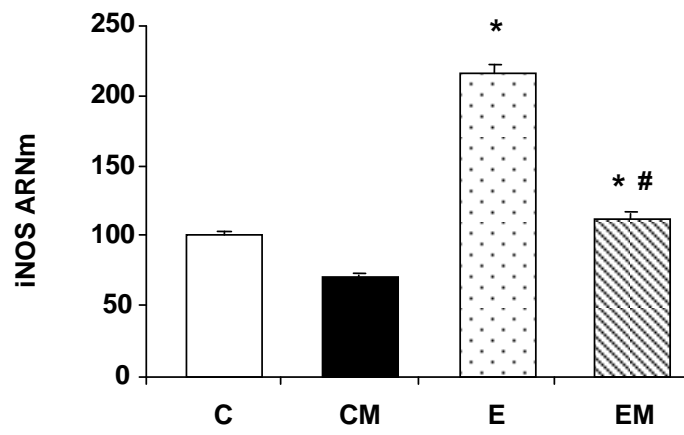
**Figura 5.** Expresión relativa de ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 por *RT-PCR*. Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p < 0,05$  respecto a control (C), # $p < 0,05$  respecto al ejercicio (E).

#### **4.5 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LOS MARCADORES INFLAMATORIOS iNOS, COX-2 E ICAM-1 EN EL MÚSCULO CARDÍACO.**

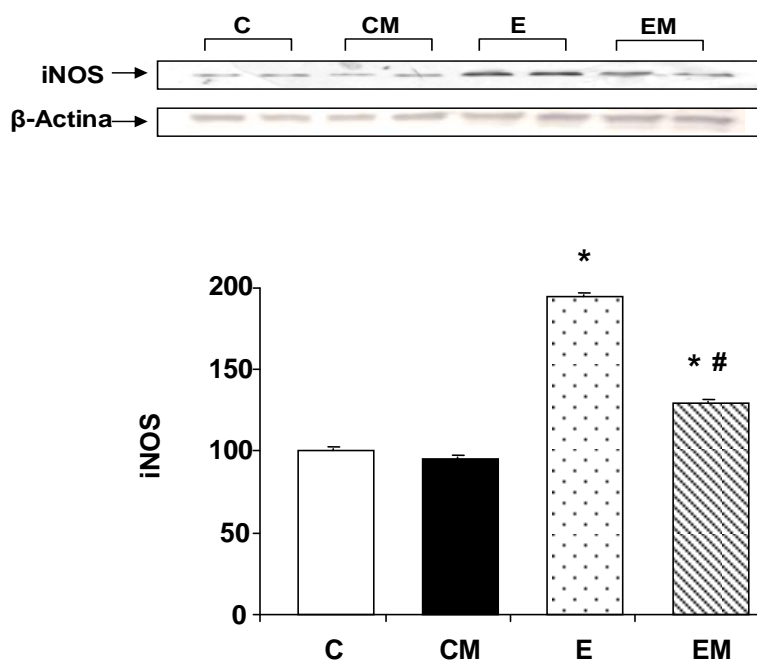
##### **Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)**

La expresión de la óxido nítrico sintetasa en su forma inducible (iNOS) en el grupo ejercicio muestra un incremento significativo tras 2 horas de finalizado el ejercicio respecto al grupo control (ARNm +115%; proteína +54%). La administración de melatonina reduce significativamente esta expresión a las 2 horas de finalizado el ejercicio (figura 6).

(A)



(B)



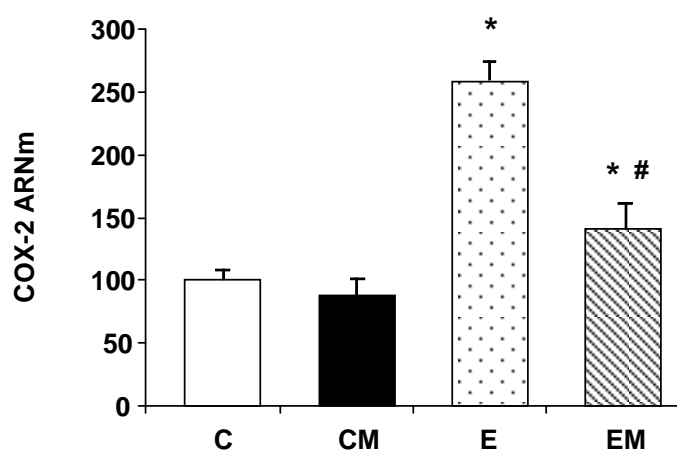
**Figura 6.** (A) Expresión relativa de ARNm de iNOS por *RT-PCR*. (B) Expresión de proteína para la iNOS por *Western blot*. Bandas: iNOS 130 kDa;  $\beta$ -Actina 40 kDa. Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p < 0,05$  respecto a control (C), # $p < 0,05$  respecto a ejercicio (E).

### Ciclooxigenasa 2 (COX-2)

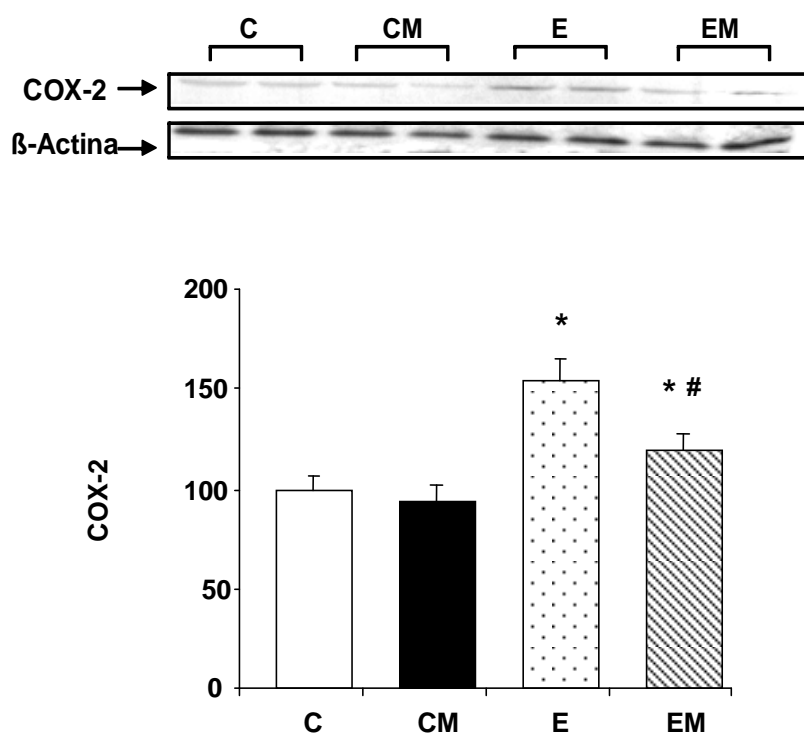
El ejercicio desarrollado produce un incremento significativo en los niveles de ARNm (+159%) y en la concentración de proteína (+54%) de la COX-2 en el músculo cardíaco tras 2 horas de su finalización, respecto al grupo control. El grupo de ejercicio que recibe una dosis de melatonina, presenta

niveles significativamente más bajos respecto al grupo ejercicio (figura 7).

(A)



(B)



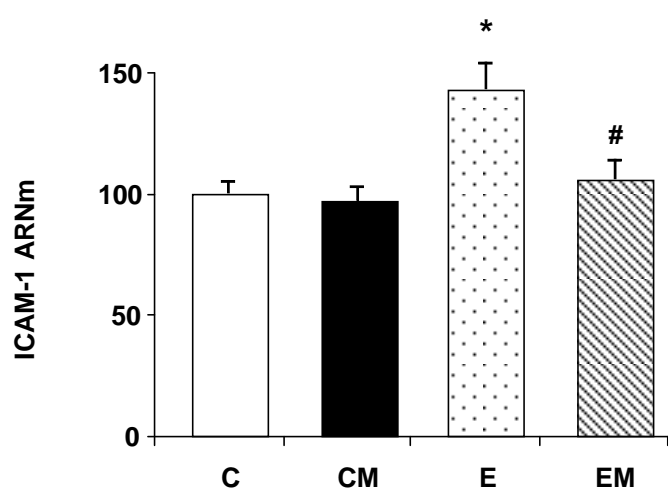
**Figura 7.** (A) Expresión relativa de ARNm de la COX-2 por *RT-PCR*. (B) Expresión de proteína para la COX-2 por *Western blot*. Bandas: COX-2 70 kDa;  $\beta$ -Actina 40 kDa. Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p < 0,05$  respecto a control (C), # $p < 0,05$  respecto al ejercicio (E).

### Molécula de adhesión endotelial (ICAM-1)

Se aprecia un incremento significativo en la expresión de ICAM-1 al comparar el grupo de ejercicio con el grupo control (+43% ARNm; +79%

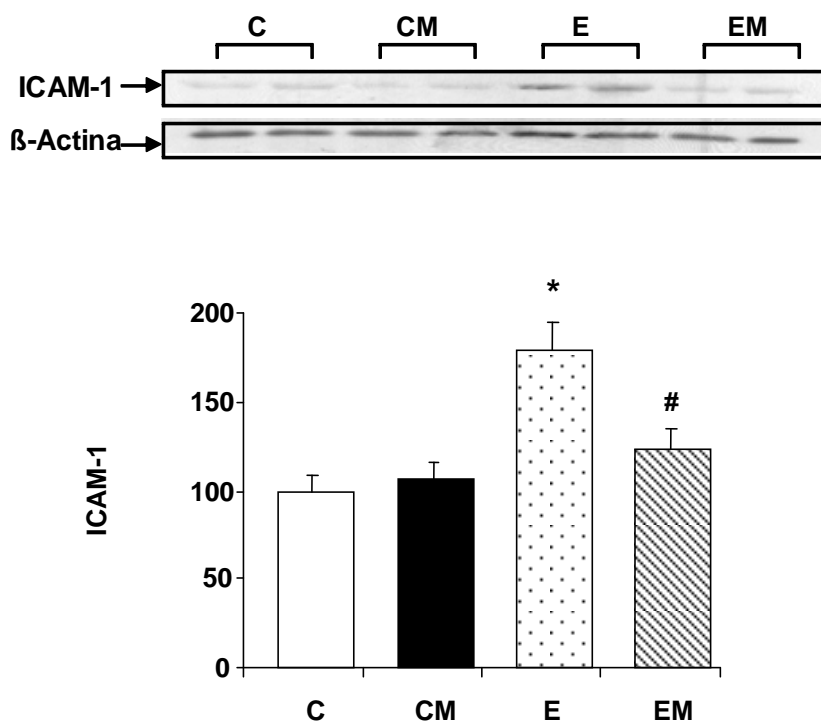
concentración de proteína). Este incremento en su expresión cardíaca es parcialmente bloqueado por la administración de melatonina (figura 8).

(A)





(B)



**Figura 8.** (A) Expresión relativa de ARNm de la ICAM-1 por *RT-PCR*. (B) Expresión de proteína para la ICAM-1 por *Western blot*. Bandas: ICAM-1 95 kDa;  $\beta$ -Actina 40 kDa. Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p < 0,05$  respecto a control (C), # $p < 0,05$  respecto al ejercicio (E).

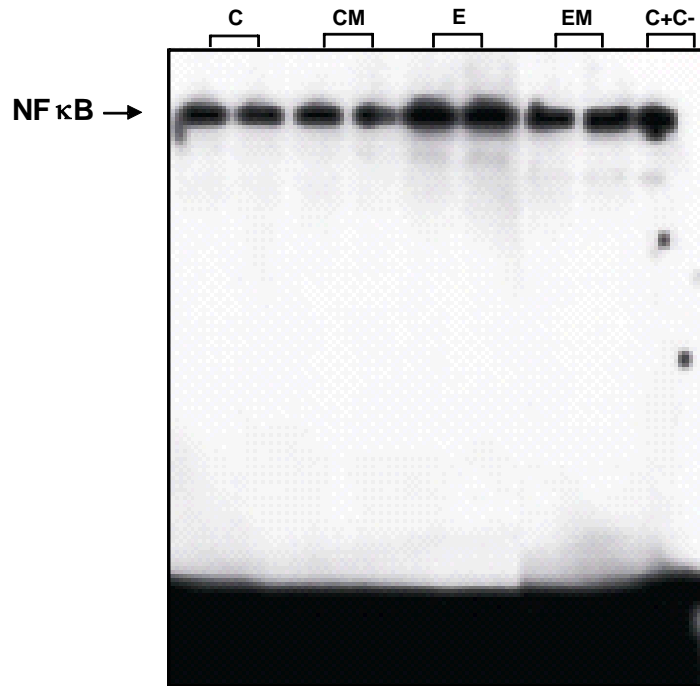
#### **4.6 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR DE TRANSCRIPCIÓN- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Y LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA RUTA DE ACTIVACIÓN: I $\kappa$ B $\alpha$ E IKK $\alpha$ EN EL MÚSCULO CARDÍACO.**

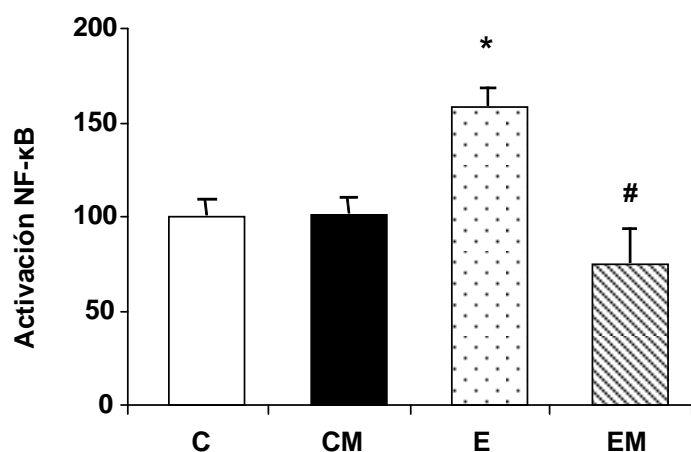
##### **Factor nuclear de transcripción- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)**

La activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) requiere de la estimulación de una serie de proteínas, fundamentalmente mediante fenómenos de fosforilación que se suceden unos a otros en cadena en el citoplasma de la célula y que concluyen con la fosforilación de las proteínas inhibidoras I $\kappa$ Bs, que son posteriormente degradadas. Esta fosforilación es llevada a cabo por un conjunto de proteínas, las IKKs, que a su vez se activan mediante fenómenos de fosforilación.

En el presente apartado se analiza el grado de activación de este factor en la fracción nuclear del músculo cardíaco, mediante la técnica de EMSA (*Electro Mobility Shift Assay*).

El análisis de los datos mostrados, siguiendo la línea de todo lo expuesto anteriormente, revela un efecto estimulador del protocolo de ejercicio sobre este factor de transcripción, se amplifica en mayor medida transcurridas 2 horas del mismo (58% respecto a los controles). Los grupos de ejercicio con tratamiento previo de melatonina presentan valores próximos a los controles y significativamente más bajos que los grupos de ejercicio sin tratamiento (figura 9).





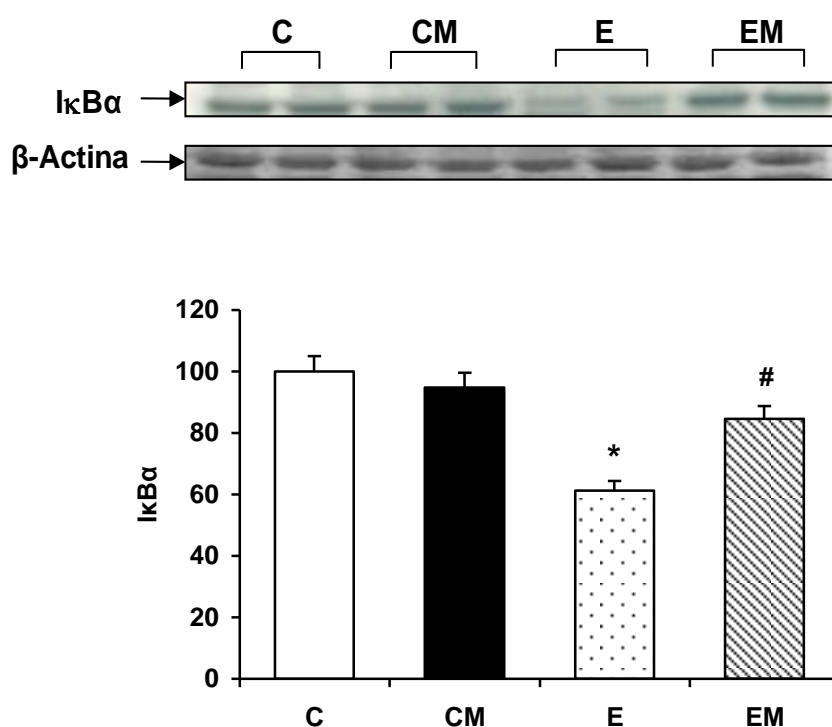
**Figura 9.** Activación del factor de transcripción nuclear-  $\kappa$ B en extracto nuclear de músculo cardíaco en los diferentes grupos experimentales. (C-: control negativo; C+: control positivo). Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p < 0,05$  respecto a los controles, # $p < 0,05$  respecto a E.

### I $\kappa$ B $\alpha$

Un requisito imprescindible para que la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) sea posible, es la liberación y posterior degradación del inhibidor que le retiene inactivo en el citoplasma, el I $\kappa$ B $\alpha$ .

En la figura 10 se muestra el efecto del ejercicio agudo sobre la expresión de esta proteína. A las 2 horas del ejercicio se observa una disminución significativa en el grupo de ejercicio (-38,73%) respecto a los controles, mientras que el grupo con tratamiento de melatonina presenta valores

cercanos a los controles y significativamente más altos respecto al grupo de ejercicio (37,43%).

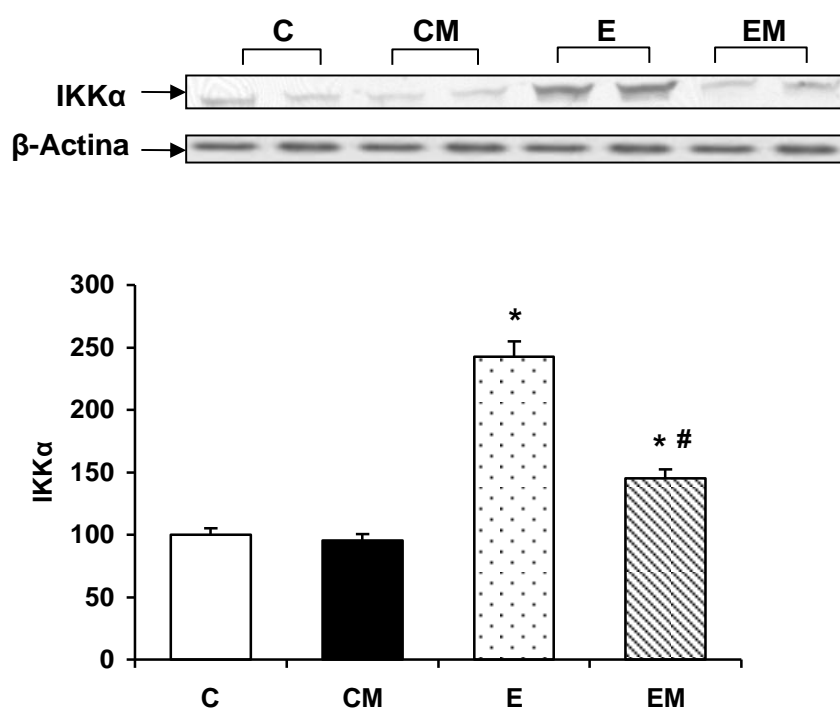


**Figura 10.** Expresión de proteína IκBα por *Western blot*. Bandas: IκBα 41 kDa; β-Actina 40 kDa. Valores medios ± E.E.M. de 8 ratas. \*p<0,05 respecto a control (C), #p<0,05 respecto al ejercicio (E).

### IKKα

Una de las subunidades que forman parte del complejo IKK y que interviene en la fosforilación del IκBα, es la IKKα. Su participación en el

proceso parece tener un carácter redundante respecto al IKK $\beta$ , aunque su expresión es vital para la supervivencia celular. El gráfico abajo expuesto indica una activación significativa de la subunidad IKK $\alpha$  y así a las 2 horas hay un incremento significativo con el ejercicio (79,44% respecto C). El tratamiento con melatonina atenúa esta respuesta frente el ejercicio (58,55% respecto al E).



**Figura 11.** Expresión de proteína IKK $\alpha$  por *Western blot*. Bandas: IKK $\alpha$  85 kDa;  $\beta$ -Actina 40 kDa. Valores medios  $\pm$  E.E.M. de 8 ratas. \* $p$ <0,05 respecto a control (C), # $p$ <0,05 respecto al ejercicio (E).

## **5 DISCUSIÓN**





## 5.1 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE PARÁMETROS METABÓLICOS

El consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub> se midieron cada 3 minutos en espirometría de circuito abierto como se describe en Material y Métodos.

En los animales estudiados, que son sedentarios, se observa que el consumo de oxígeno aumenta paulatinamente a partir del nivel basal a medida que se hace ejercicio. De igual manera al realizar ejercicio físico se incrementa la producción de CO<sub>2</sub>.

El contenido de carbono y oxígeno en los distintos nutrientes (hidratos de carbono, grasas y proteínas) difiere sustancialmente, por lo que la proporción entre la cantidad de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> liberado y consumido en la respiración, denominada cociente respiratorio o intercambio respiratorio ( $Q=VCO_2/VO_2$ ), puede dar una idea del sustrato energético empleado y la energía liberada durante la actividad física.

El cociente respiratorio nos proporciona valores de los "combustibles" utilizados. El cociente en reposo alcanza un valor cercano al 0,80, lo que significa que se está metabolizando en forma preponderante ácidos grasos libres (AGL) sobre la glucosa. A medida que se incrementa la intensidad del esfuerzo este valor también se va incrementando, pudiendo llegar a valores por encima de 1, lo que significa que se está consumiendo en forma preponderante glucosa. Esto se debe a que la cantidad de oxígeno necesario en nuestro organismo para metabolizar una molécula es

inversamente proporcional al contenido en carbono de dicha molécula, siendo más fácil oxidar los hidratos de carbono que los ácidos grasos libres, ya que estos requieren más oxígeno (González-Gallego y cols., 2006).

En fondistas altamente entrenados se pueden desplegar esfuerzos más intensos en relación a personas de vida sedentaria y seguir utilizándose los AGL durante la mayor parte de la prueba y reservando los hidratos de carbono para las fases finales (Riddell, 2008).

Cuando se observan los valores del cociente respiratorio de las ratas ejercitadas, se observa que el mismo se incrementa respecto al inicio a lo largo del tiempo, lo que sugiere un cambio en el sustrato utilizado sobre todo en los momentos finales del ejercicio y una mayor contribución de los hidratos de carbono como sustrato.

Sin embargo los animales que recibieron melatonina presentan en el minuto 50 del protocolo de ejercicio un menor cociente respiratorio respecto al grupo E y este se mantiene sin modificaciones significativas a lo largo de todo el ejercicio, lo que sugiere un metabolismo aerobio dependiente fundamentalmente de los ácidos grasos libres. Esto está en concordancia con un estudio previo de nuestro propio grupo (Mazepa y cols., 2000) en el cual la administración de melatonina antes de la realización de un ejercicio físico preservaba el glucógeno muscular e incrementaba el consumo de grasas. En dicha investigación, los animales que realizaron un ejercicio agudo exhaustivo a la finalización del mismo presentaban hipoglucemia con un incremento plasmático de la

concentración de lactato y  $\beta$ -hidroxibutirato acompañado de una disminución significativa de glucógeno tanto muscular como hepático. Sin embargo aquellos animales que previo mostraban una glucemia y unas concentraciones de glucógeno hepático y muscular significativamente mayores que los que no la habían recibido. Así mismo, el perfil lipídico plasmático era diferente, con una cetogénesis incrementada y una concentración menor de ácidos grasos libres en plasma. Este efecto de la melatonina sobre el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos también ha sido descrito por otros autores (Kim y cols 2004).

De forma paralela la mayor utilización de grasas implica un consumo energético, mayor como observamos en los animales que recibieron melatonina.

## **5.2 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR: CREATÍN QUINASA TOTAL (CK), CREATÍN QUINASA CARDÍACA (CK-MB) Y MIELOPEROXIDASA (MPO)**

Son numerosos los estudios que, durante las últimas décadas, consideran el ejercicio físico agudo o de elevada intensidad como un importante generador de situaciones de muerte súbita o infarto agudo de miocardio en individuos especialmente susceptibles. En la actualidad existen evidencias de que el ejercicio físico intenso puede originar una disfunción miocárdica de forma transitoria.

El indicador bioquímico más utilizado para valorar el daño muscular es la medición de la liberación al plasma de la enzima CK. Aunque en nuestro estudio, los niveles plasmáticos de la actividad de CK y CK-MB aumentaron significativamente después del ejercicio, hay que tener en cuenta que la enzima CK se libera tanto tras daño en el músculo esquelético como en el daño del miocardio mientras que la CK-MB (isoenzima cardíaca) se libera solamente tras el daño en músculo cardíaco. Este hecho concuerda con valores demostrados en atletas de resistencia (König y cols., 2007).

Los datos aportados en el presente trabajo indican, en referencia a estas actividades enzimáticas, que el protocolo de ejercicio ejecutado implica un grado significativo de daño muscular tanto esquelético como cardíaco, como se evidencia por el incremento en los niveles de las enzimas comentadas en plasma. Este incremento fue significativamente menor en los grupos de ejercicio que reciben el tratamiento de melatonina, de modo que, a las dos horas del fin del ejercicio, estos niveles se acercan a los valores de los controles. Esto podría indicarnos la participación de mecanismos indirectos propiciados por la acción de la melatonina.

En los últimos años ha existido mucho interés en el comportamiento de la MPO en la patogénesis inflamatoria, incluyendo el daño inducido por el ejercicio agudo en diferentes tejidos (Morozov y cols., 2006). La enzima mieloperoxidasa MPO es liberada por los neutrófilos activados y por lo tanto, es una medida indirecta de la infiltración leucocitaria en los tejidos (Huang y cols., 2008). El incremento de la MPO se ha descrito en el

corazón de la rata después del ejercicio agudo (Belcastro y cols., 1997), un hallazgo confirmado en el presente estudio.

Actualmente se utiliza la actividad de la mieloperoxidasa como marcador en diferentes estudios clínicos caracterizados por estrés oxidativo, inflamación, y activación de neutrófilos. Así se ha demostrado un incremento de esta actividad en pacientes con patología coronaria que mostraban un patrón angiográfico normal (Zhang y cols., 2001; Apple y cols., 2005).

La supresión por la administración previa de melatonina sugiere ya un efecto antiinflamatorio de la misma en el modelo de ejercicio utilizado en el presente trabajo.

### **5.3 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LAS CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN EL MÚSCULO CARDÍACO**

Hay que tener en cuenta que el ejercicio representa un estrés para el organismo, lo que origina una serie de alteraciones metabólicas y celulares, también se pueden producir como consecuencia del ejercicio pequeñas roturas celulares, que a veces originan pequeños puntos inflamatorios. Como consecuencia de todo lo anterior, se produce una respuesta de fase aguda con liberación de citoquinas en el sitio de la inflamación (Martínez-Flores y cols., 2005).

En nuestro estudio se observaron elevados niveles de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 después del ejercicio agudo. Estos

marcadores inflamatorios pueden producir algunos efectos con características similares al fallo cardíaco (Paulus, 2000), y pueden ser responsables, en parte, de la progresión de la enfermedad en pacientes con fallo cardíaco crónico (Gullestadd y Aukkrust, 2001). Además, tanto en el ejercicio agudo y como en las enfermedades cardíacas, las citoquinas pro-inflamatorias pueden tener consecuencias desfavorables en el sistema inmune.

Los niveles circulantes de TNF e IL-6 están elevados en pacientes con insuficiencia cardíaca, particularmente aquellos con caquexia cardíaca y decompensación edematosa. Los estudios han demostrado una relación directa entre los niveles de estas citoquinas y un deterioro funcional en diferentes clases de insuficiencia cardíaca. La concentración plasmática de TNF y sus receptores solubles (sTNFR1 y sTNFR2) así como de IL-6 (pero no su receptor soluble) predicen la mortalidad independientemente de la edad, el sexo, la etiología del fracaso del corazón, la fracción de eyección o la concentración sérica de sodio (Murray y Freeman, 2003).

La melatonina podría ejercer sus efectos antiinflamatorios disminuyendo la acción de ciertas citoquinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a través inhibición de NO plasmáticos, así como en la expresión iNOS (Reiter y cols., 2000; Johe y Østerud, 2005; Kireev y cols., 2008).

Otros autores como Johe y Østerud (2005) muestran que la administración de melatonina 30 min antes del ejercicio físico disminuye significativamente la actividad del factor tisular (TF) inducida por LPS en los monocitos y el

aumento del número de linfocitos después de ejercicio. La melatonina también tiende a causar una reducción en la concentración plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-8 y LTB<sub>4</sub>. Nuestros resultados son coincidentes con estos autores que indican como la administración de la melatonina parece tener potencial para contrarrestar el aumento de los productos pro-inflamatorios después del ejercicio físico intenso.

#### **5.4 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE MARCADORES INFLAMATORIOS iNOS, COX-2 E ICAM-1 EN EL MÚSCULO CARDÍACO**

El óxido nítrico y las prostaglandinas también participan en la inflamación, y así la isoforma inducible de la NOS (iNOS) y la COX-2 respectivamente, son responsables de la producción de grandes cantidades de estos marcadores pro-inflamatorios (Tuñón y cols., 2009). El ejercicio físico agudo aumenta el índice metabólico y el consumo de oxígeno y consecuentemente hay un incremento en la generación de EROs en los tejidos, tales como el músculo esquelético y miocardio (Alonso y cols., 2006).

En apartados anteriores se ha reseñado la importancia del óxido nítrico en multitud de procesos fisiológicos en los cuales actúa como vasodilatador, neurotransmisor, antimicrobiano e inmunomodulador. Se ha destacado a su vez su acción como potente radical reaccionando con otros radicales libres, con el oxígeno molecular y algunos metales pesados. Los efectos deletéreos del NO se atribuyen fundamentalmente al producto de su reacción con el anión superóxido, el peroxinitrito, el cual es un potente

agente oxidante y nitrosante, cuya acción puede acarrear la oxidación del ADN y los fosfolípidos de la membrana celular (Alonso y cols., 2006).

Durante la inflamación, la destrucción indiscriminada de células y tejidos por el óxido nítrico y especies reactivas de nitrógeno pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de muchos procesos inflamatorios y, por tanto, la producción de óxido nítrico inducido por iNOS puede reflejar el grado de inflamación y proporcionar una medida para evaluar el efecto de fármacos en el proceso inflamatorio (Torres y cols., 2004).

La COX-2 es una enzima inducida por gran variedad de factores entre los que se encuentran citocinas, factores de crecimiento y promotores tumorales y ha sido implicada en procesos inflamatorios y carcinogénesis. También ha sido implicada en la inhibición de la apoptosis y como promotora de la angiogénesis a través de la activación del NF- $\kappa$ B y modula la función inmunitaria e incrementa la invasividad tumoral (El-Bassiouny y cols., 2008).

La COX-2, desempeña un papel crucial en el daño del tejido inducido por algunos tipos de ejercicio y se sobreexpresa en el ejercicio excéntrico (Jiménez-Jiménez y cols., 2008; Chiang y cols., 2009).

Aunque los datos sobre la expresión y la actividad de COX-2 en el músculo estriado son contradictorios, en investigaciones recientes se indica que se expresa y es activa enzimáticamente en miocitos cardíacos (Testa y cols., 2007).



El papel exacto de la sobrerregulación de genes pro-inflamatorios sigue siendo poco claro. La inducción de la expresión de la iNOS da como resultado la generación de óxido nítrico, que juega un papel importante en la inmunomodulación y contribuye a la defensa del organismo por sus propiedades antimicrobianas. Sin embargo, el óxido nítrico producido en exceso se sabe que actúa como agente de daño tisular, que está implicado en la inflamación crónica y otros procesos patológicos (Martínez-Flores y cols., 2005).

De igual manera la COX-2 también pueden ejercer efectos beneficiosos o perjudiciales en función de la intensidad de su inducción, de su efecto fisiopatológico y de la capacidad de las células para metabolizar PGH2 (Bolli et al., 2002). Por lo tanto, no está claro si la sobreexpresión de genes pro-inflamatorios posee *in vivo* un papel inmunorregulador o dañan las células. De hecho, la atenuación de la activación de NF-kB y la expresión de los genes proinflamatorios iNOS y COX-2 con la administración de melatonina presente en nuestro estudio apoya su posible efecto terapéutico en la respuesta inflamatoria sistémica.

Algunas de las moléculas de adhesión celular son liberadas al plasma como formas solubles, cuya presencia indica el grado de la activación del endotelio vascular o una disfunción del mismo. Una elevación en las concentraciones plasmáticas de moléculas de adhesión solubles puede obstaculizar la respuesta inmunitaria y se ha sugerido su posible papel como mediadores en la inflamación aterosclerótica, en el riesgo de

enfermedades cardiovasculares y en el fallo cardíaco (Petidrou y cols., 2007).

Al mismo tiempo también está claro que el ejercicio agudo conduce a incrementos en las moléculas de adhesión como el ICAM-1, que desempeñan un papel importante en la migración de leucocitos de la circulación y su intervención en los sitios de la inflamación (Bartzeliotou y cols., 2007). Sin embargo existen pocos estudios que evalúen dicha situación en el músculo cardíaco. En nuestro estudio se observa un incremento de la ICAM-1 tras el protocolo de ejercicio, efecto que se ve atenuado en los animales que recibieron melatonina.

Algunas de las propiedades antioxidantes de la melatonina son debidas a su efecto genómico en la regulación de la expresión de proteínas y la actividad de enzimas antioxidantes, así como la inhibición de la expresión de enzimas prooxidantes/proinflamatorias como la iNOS, COX-2 e ICAM-1 (Escames y cols., 2006). Recientemente Rodella y cols. (2010) han demostrado el efecto beneficioso de la melatonina sobre el desarrollo de la aterosclerosis e hipertensión originada por la nicotina al inhibir la activación y la fosforilación de ERK 1/2. Esta enzima, a su vez, activa el TGF- $\beta$ 1 y el NF- $\kappa$ B, que respectivamente, estimulan la síntesis de colágeno tipo I, responsable de la fibrosis y, además, ICAM-1, VCAM-1. Así la melatonina es capaz de minimizar los efectos negativos de la nicotina al bloquear la activación de ERK y las otras vías de señalización en la que esta enzima está implicada.

### **5.5 EFECTOS DEL EJERCICIO AGUDO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR DE TRANSCRIPCIÓN $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Y LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA RUTA DE ACTIVACIÓN: I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$ EN EL MÚSCULO CARDÍACO.**

Según Baldwin (2001) el factor de transcripción NF- $\kappa$ B controla la expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios, inmunes, y otros relacionados con el cáncer y la apoptosis. En su forma inactiva, este factor permanece en el citoplasma unido a su proteína inhibidora, I $\kappa$ B, situación que bajo la acción de estímulos de muy diversa índole se ve alterada (Dossumbekova y cols., 2007). El factor nuclear se puede activar por una gran cantidad de estímulos tales como: radicales libres de oxígeno y nitrógeno y citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6).

La fosforilación de las proteínas I $\kappa$ Bs es un paso clave en la regulación de los complejos Rel/NF- $\kappa$ B. Dicha fosforilación está mediada por las denominadas I $\kappa$ B kinasas (IKKs), cuya actividad se ve fuertemente inducida por los agentes activadores de esta ruta de señalización. Esta actividad enzimática se refiere a un complejo proteico de elevado peso molecular, constituido por tres subunidades, dos de ellas catalíticas (pueden llevar a cabo la fosforilación): IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y una tercera reguladora: IKK $\gamma$  o NEMO (Dossumbekova y cols., 2007). Las tres subunidades presentan una homología del 52% en cuanto a su composición en aminoácidos y una organización estructural muy similar

que incluye, un dominio kinasa, una cremallera de leucina y dominios hélice-bucle-hélice. Pueden formar heterodímeros y homodímeros.

Los estudios genéticos y bioquímicos realizados en ratones revelan que el IKK $\beta$  sería la kinasa principal involucrada en el proceso de activación del NF- $\kappa$ B, desempeñando el IKK $\alpha$  un papel redundante y accesorio. En cualquiera de los casos, los genes para ambas subunidades son imprescindibles para la supervivencia del animal (Karagounis y cols., 2010).

El complejo IKK activo fosforilará a la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  en dos residuos de serina cercanos a su extremo N-terminal, de modo que la proteína queda marcada para su posterior reconocimiento por el complejo ubiquitín-ligasa E3, que ubiquitina dos residuos de lisina cercanos al extremo N-terminal (Dossumbekova y cols., 2007; Karagounis y cols., 2010). Esto a su vez sirve de señal para el proteasoma 26S que procede a la degradación del I $\kappa$ B $\alpha$  (Karagounis y cols., 2010). Estos estímulos desencadenan una serie de acontecimientos que finalmente conducen a la fosforilación de su inhibidor I $\kappa$ B, y la posterior translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo celular donde se une a promotores específicos de genes estimulando su transcripción.

El ejercicio físico promueve una gran variedad de acontecimientos fisiológicos que pueden conducir, en última instancia, a la activación del NF- $\kappa$ B. En el proceso se produce la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  por la I $\kappa$ B kinasa (IKK). La fosforilación por IKK, dispone a I $\kappa$ B para la ubiquitinación y posterior degradación proteolítica por el proteasoma 26S (Zamanian-

Daryoush y cols., 2000).

Así, se sabe que durante los procesos de contracción muscular intensos, la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), se incrementa en el músculo dañado debido a la infiltración de neutrófilos (Smith y cols., 1996; Cannon y St. Pierre, 1998; Pedersen y cols., 1998). La expresión de estas citoquinas también se encuentra bajo la regulación del NF- $\kappa$ B (Baeuerle y Henkel, 1994).

Estos datos han sido confirmados en un estudio previo hecho en nuestro grupo, que revela que la activación de IKK $\alpha$  y la proteólisis de I $\kappa$ B $\alpha$  en el músculo esquelético de rata son factores de activación y translocación nuclear del factor- $\kappa$ B (Alonso et al., 2006).

Los resultados del presente trabajo demuestran de la misma forma que el ejercicio agudo activa el NF- $\kappa$ B en el músculo cardíaco de ratas. La activación del NF $\kappa$ B se manifiesta de forma significativa dos hora después de finalizado el ejercicio, hecho que se acompaña de un detrimento en los niveles de I $\kappa$ B $\alpha$ , y un aumento en la activación de la subunidad IKK $\alpha$ .

Estudios realizados en músculo esquelético que constatan incrementos en la activación del NF- $\kappa$ B y de la iNOS en pacientes con miopatías inflamatorias (Mackiewicz y cols., 2003), sepsis (Lanone y cols., 2002), fallo cardíaco crónico (CHF) (Adams y cols., 2003) y disfunción pulmonar obstructiva crónica (COPD) (Agustí y cols., 2004). Sin embargo en la actualidad son escasos los estudios centrados en las alteraciones ocasionadas en el músculo cardíaco.

Los avances metodológicos en los últimos tiempos han permitido un análisis más detallado de los mecanismos de regulación de la expresión de genes y proteínas y de los estímulos que inducen dicha expresión. En una gran variedad de tipos celulares y de tejidos, como el hígado (Díaz-Guerra y cols., 1997), la participación del NF- $\kappa$ B es esencial en la expresión del gen de la iNOS inducida por la acción de las citoquinas (Barnes y Karin, 1997) y otros estímulos (Díaz-Guerra y cols., 1997). En tejido hepático se observa como la acción de las citoquinas promueve la expresión de la iNOS, hecho que está íntimamente asociado a la activación del factor NF- $\kappa$ B y que se ve anulado de forma específica por la acción de ciertos compuestos antioxidantes como la N-acetil-cisteína (NAC) (Majano y cols., 2004).

El producto resultante de la acción de la iNOS, el óxido nítrico, ejerce a su vez una función reguladora sobre el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, que como ha sido citado anteriormente, constituye una pieza clave en la estimulación de la expresión de la iNOS (Griscavage y cols., 1996). Así, se ha visto que pequeños niveles de NO promueven la activación del NF- $\kappa$ B y un incremento en la transcripción del gen de la iNOS (Matthews y cols., 1996; Park y cols., 1997).

De esta forma se conoce que la activación de NF- $\kappa$ B es clave para la activación de la expresión iNOS en el músculo gastrocnemio de rata (Gomez-Cabrera y cols., 2005) y el miocitos del músculo esquelético (Adams y cols., 2002).

Además, se ha observado una correlación entre la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de iNOS en el músculo esquelético de pacientes con fallo cardíaco crónico (Adams y cols., 2003), y que la administración del ditiocarbamato pirridolínico, un inhibidor de NF- $\kappa$ B que regula la transcripción de la iNOS, protege contra la isquemia/reperfusión en el músculo cremáster en la rata (Qi y cols., 2004).

Según lo expuesto anteriormente parece que el NF- $\kappa$ B desempeñaría un papel decisivo estimulando la expresión de la enzima iNOS. Sin embargo no se puede concluir con esto que dicha ruta sea la única que participe en la activación de la iNOS. Vías de señalización independientes que conducen a la estimulación de la expresión de la iNOS en respuesta a la acción de las citoquinas IL-1 y TNF- $\alpha$ , es un hecho ya apuntado por Doi y cols. (2002).

El presente trabajo ratifica el papel antiinflamatorio atribuido por otros autores a la melatonina, que en el caso particular de la expresión de la iNOS actúa restaurando el incremento promovido de la misma por el ejercicio agudo en el músculo cardíaco.

Por otra parte aunque hasta el momento no existan estudios que confirmen la relación de la expresión de COX-2 o ICAM-1 con la activación de NF- $\kappa$ B en el músculo esquelético o cardíaco de ratas o humanos, se sabe que la expresión de moléculas de adhesión en los leucocitos circulantes y presentes en el endotelio son también regulados por el NF- $\kappa$ B (Szcepanik,

2007), y los genes promotores de ICAM-1 poseen lugares de unión para el NF- $\kappa$ B (Li y cols., 2005).

La cardioprotección que ofrece la terapia génica a través de iNOS esta mediada por la COX por una vía dependiente del NF- $\kappa$ B (Li y cols., 2007) y ambas, tanto la sobreexpresión de la COX-2 como la activación del NF- $\kappa$ B inducido por el ejercicio físico puede inhibirse mediante el entrenamiento (Jiménez-Jiménez y cols., 2008).

El papel de la melatonina como antioxidante ha hecho apostar, ya en numerosos estudios, acerca de su potencial acción como modulador del factor NF- $\kappa$ B. Estos supuestos se han confirmado en trabajos como el desempeñado por Chuang y cols. (1996), en el que relacionan el pico de producción nocturna de melatonina, así como la administración de dosis exógenas de la misma (10 mg/kg), con un detrimento en la activación del NF- $\kappa$ B en bazo de ratas. Cuzzocrea y Reiter (2002) proponen que ciertas propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de la melatonina se basan en su capacidad para inhibir la activación del NF- $\kappa$ B y la expresión de los diferentes mediadores pro-inflamatorios.

La acción inhibitoria de la melatonina sobre la activación del NF- $\kappa$ B se ha relacionado también con la supresión en la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales tratadas con TNF- $\alpha$  (Sasaki y cols., 2002). La efectividad de la administración de dosis bajas de melatonina (3 mg/kg) frente al daño inducido por la tioacetamida (TAA) en el hígado de ratas ha sido probada en un trabajo. En dicho estudio la administración de



melatonina previa al tratamiento con TAA atenúa el incremento en la activación del NF- $\kappa$ B y de la expresión de la iNOS inducidos por dicho tratamiento (Bruck y cols., 2004). En la línea de lo anteriormente expuesto, otros muchos trabajos constatan el papel inhibitor de la melatonina sobre la activación del NF- $\kappa$ B en distintos tejidos y tipos celulares, como en el bazo de ratas (Chuang y cols., 1996), en neuronas del cerebelo (Lezoualc'h y cols., 1998; Post y cols., 1998) y en cultivos de macrófagos (Gilad y cols., 1998).

De igual forma estudios previos indican que la melatonina reduce la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de ICAM-1 en ratas con colitis (Torres y cols., 2004) o bloquea la expresión de iNOS y translocación de NF- $\kappa$ B en el músculo esquelético de ratas ejercitadas (Alonso y cols., 2006).

En resumen el presente trabajo muestra como la situación impuesta por el modelo de ejercicio agudo empleado, conduce a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el músculo cardíaco. Esta activación, desencadenada presumiblemente por una mayor producción de ERO y un proceso inflamatorio durante el ejercicio, conlleva la puesta en marcha de la ruta de activación constitutiva, aunque es posible que alguna ruta alternativa se establezca en el músculo cardíaco.

Los resultados en el presente estudio demuestran que, en un modelo experimental, el ejercicio agudo induce la expresión de diferentes moléculas pro-inflamatorias que en asociación con activación del factor NF- $\kappa$ B, podría originar daño en los cardiomiocitos y el fallo cardíaco.

La cuestión que se nos plantea es cuándo el ejercicio físico puede ser perjudicial para los cardiomiocitos o incluso si puede llegar a provocar una alteración funcional del miocardio a largo plazo hecho de vital importancia durante una actividad física intensa o la práctica de deportes de élite.

Por lo tanto, es preciso la realización de más estudios en profundidad para investigar la causa y el efecto del estrés del miocardio inducido por el ejercicio y sus efectos en los mediadores inflamatorios.

Los datos obtenidos indican también que la administración de melatonina tiene efectos protectores contra los daños causados por el ejercicio agudo en el corazón de las ratas, impidiendo la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de los mediadores pro-inflamatorios. Aunque nuestros resultados se suman a estudios previos que apoyan el que la melatonina es un regulador de la inflamación (Kireev y cols., 2008; Huang y cols., 2008; Rodriguez y cols., 2007; Le y cols., 2007; Tengattini y cols., 2008), se hacen necesario mas estudios para identificar los mecanismos responsables del potencial efecto anti-inflamatorio de la esta molécula en músculo cardiaco.

## **6 CONCLUSIONES**



### **Conclusión primera**

La administración de melatonina previa al ejercicio mantiene constante el cociente respiratorio a lo largo del mismo, en valores que se pueden considerar indicativos de la utilización de grasas como sustrato energético, con un ahorro de hidratos de carbono que no se produce en los animales ejercitados sin tratamiento.

### **Conclusión segunda**

El tratamiento con melatonina previene el incremento en los niveles de diversos marcadores de daño muscular (CK, CK-MB y MPO) inducidos por un protocolo de ejercicio agudo, lo que indica la existencia de efectos beneficiosos de esta molécula sobre el tejido cardíaco.

### **Conclusión tercera**

El protocolo agudo de ejercicio físico incrementa los niveles en músculo cardíaco del RNAm y proteína de los diferentes mediadores de la inflamación (iNOS, COX-2, ICAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) estudiados. Este efecto se previene parcial o totalmente por la administración de melatonina, lo que sugiere un efecto transcripcional de la hormona.

### **Conclusión cuarta**

La administración de melatonina reduce la activación que el ejercicio agudo induce sobre NF- $\kappa$ B en el músculo cardíaco. La inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B podría a su vez explicar la reducción en la expresión

de iNOS, COX-2, ICAM-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6.

### **Conclusión quinta**

La administración de melatonina previene la degradación del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  y el aumento en la expresión de IKK $\alpha$  inducidos en el músculo cardíaco por el ejercicio agudo. Estos efectos explicarían la reducción en la activación de NF- $\kappa$ B inducida por la hormona

### **Conclusión final**

El presente trabajo aporta datos novedosos acerca del papel de la melatonina como agente antiinflamatorio de utilidad para la prevención de posibles alteraciones inducidas por el ejercicio físico, aunque se requieran mas estudios sobre su posible aplicabilidad en el campo clínico.

## **7 BIBLIOGRAFÍA**





**Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.** *Imunología celular y molecular*. Madrid: 5ed Elsevier 2004: 127-345.

**Abbot B.** Creatinine kinase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984: 1112-1116.

**Acuña-Castroviejo D., Escames G., León J., Carazo A., Khaldy H.** Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med and Biol* 2003; **527**: 549-557.

**Adams D.H., Shaw S.** Leucocyte endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1994; **343**: 831-836.

**Adams V., Nerhoff B., Spate U., Linke A., Schulze P.C., Baur A., Gielen S., Hambrecht R., Schuler G.** Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B activation: an in vitro and in vivo study. *Cardiovasc Res* 2002; **54**: 95-104.

**Adams V., Spate U., Krankel N., Schulze P.C., Linke A., Schuler G., Hambrecht R.** Nuclear factor- $\kappa$ B activation in skeletal muscle of patients with chronic heart failure: correlation with the expression of inducible nitric oxide synthase. *J Cardiovasc Risk* 2003; **10**: 273-277.

**Adan A., Prat G.** *Psicofarmacología en esquemas*. Colección Salud. Barcelona: Publicacions i Edicions Universitat de Barcelona, 2007.

**Agustí A., Morlá M., Sauleda J., Saus C., Busquets X.** NF- $\kappa$ B activation and iNOS upregulation in skeletal of patients with COPD and low body weight. *Thorax* 2004; **59**: 483-487.

**Aimoto T., Rohde B.H, Chiou G.C., Lauber J.K.** N-acetyltransferase activity in the eyes of glaucomaous chickens. *J Ocular Pharmacol* 1985; **1**: 149-60.

**Akira S., Taga T., Kishimoto T.** Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; **54**: 1-78.

**Akova B., Surmen-Gur E., Gur H., Dirican M., Sarandole E., Kucukoglus S.** Exercise induced oxidative stress and muscle performance in healthy women role of vitamin E. *J Appl Physiol* 2001; **84**: 141-147.

**Alcamo E., Mizgered J.P., Horwitz B.H., Bronson R., Beg A.A., Scott M., Doerschuk C.M., Hynes R.O., Baltimore D.** Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF- $\kappa$ B in leukocyte recruitment. *J Immunol* 2001; **167**: 1592-1600.

**Ali S., Mann D.A.** Signal transduction via the NF-kappaB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell Biochem Funct* 2004; **22**: 67-79.

**Alonso M., Collado P.S., González-Gallego J.** Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor  $\kappa$ B activation in rat skeletal muscle. *J Pineal Res* 2006; **41**: 8-14.

**Apple F.S., Tesch P.A.** CK and LD isozymes in human single muscle fibers in trained athletes. *J Appl Physiol* 1989; **66**: 2717-2720

**Apple F.S., Wu A.H., Mair J., Ravkilde J., Panteghini M., Tate J., Pagani F., Christenson R.H., Mockel M., Danne O., Jaffe A.S.** Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2005; **51**: 810-824.

**Arakawa K.** Exercise a measure to lower blood pressure and reduce other risks. *Clin Exp Hypertens* 1999; **21**: 797-803.

**Ascensão A., Ferreira R., Magalhães J.** Exercise-induced cardioprotection-biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 2007; **17**:16-30.

**Axelrod J.** The pineal gland: a neurochemical transduce. *Science* 1974; **184**: 1341-1348.

**Axelrod J., Weissbach H.** Purification and properties of hydroxyindole-O-methyltransferase. *J Biol Chem* 1961; **236**: 211-213.

**Baeuerle P.A., Henkel T.** Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1994; **12**: 141-179.

**Baldwin A.S.** Series introduction: the transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. *J Clin Invest* 2001; **107**: 3-6.

**Barnes P.J., Karin M.** Nuclear factor  $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1066-1071.

**Bar-Shai M., Carmeli E., Ljubuncic P., Reznick A.Z.** Exercise and immobilization in aging animals: The involvement of oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation. *Free Rad Bio Med* 2008; **44**: 202–214.

**Bartzeliotou A.I., Margeli A.P., Tsironi M., Skenderi K., Bacoula C., Chrousos G., Papassotiriou I.** Circulating levels of adhesion molecules and markers of endothelial activation in acute inflammation induced by prolonged brisk exercise. *Clin Biochem* 2007; **40**: 765–770.

**Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1620-1624.

**Belcastro A.N., Arthur G.D., Albisser T.A., Raj D.A.** Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *J Appl Physiol* 1997; **80**: 1331-1335.

**Boden-Albala B., Sacco R.L.** Lifestyle factors and stroke risk; exercise, alcohol, diet, smoking, drug use, and stress. *Curr Atheroscler Rep* 2000; **2**: 160-166.

**Boghossian S., Alliot J.** A moderate swimming exercise regularly performed throughout the life induces age and sex-related modification in adaptive macronutrients choice. *Mech Ageing Dev* 2000; **120**: 95-109.

**Bolli R., Shinmura K., Tang X.L., Kodani E., Xuan Y.T., Guo Y., Dawn B.** Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/ reperfusion injury and mediates the late phase of reconditioning. *Cardiov Res* 2002; **55**: 506–519.

**Botting R., Ayoub S.S.** COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; **72**: 85-87.

**Bradley P.P., Priebat P.A., Christensen R.D., Rothstein G.R.** Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; **78**: 206-209.

**Bruck R., Aeed H., Avni Y., Shirin H., Matas Z., Shakhmurov M., Avinoach I., Zozulya G., Weizman N., Hochman A.** Melatonin inhibits nuclear factor  $\kappa$ B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol* 2004; **40**: 86-93.

**Brunsgaard H.** Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol* 2005; **78**: 819-835.

**Buzzelli M.D., Navaratnarajah M., Ahmed T., Nagarajan M., Shumate M.L., Lang C.H., Cooney R.N.** Nuclear factor kappaB mediates the inhibitory effects of interleukin-1 on growth hormone-inducible gene expression. *J Trauma* 2008; **64**: 1427-1435.

**Cahill G.M., Berharse J.C.** Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1098-1102.

**Cannon J.G., St. Pierre B.A.** Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Moll Cell Biochem* 1998; **179**: 159-167.

**Cao Z., Zhu H., Zhang L., Zhao X., Zweier J.L., Li Y.** Antioxidants and phase 2 enzymes in cardiomyocytes: chemical inducibility and chemoprotection against oxidant and simulated ischemia–reperfusion injury. *Exp Biol Med* 2006; **231**: 1353–1364.

**Chiang J., Shen Y.C., Wang Y.H., Hou Y.C., Chen C.C., Liao J.F., Yu M.C., Juan C.W., Liou K.T.** Honokiol protects rats against eccentric exercise induced skeletal muscle damage by inhibiting NF- $\kappa$ B induced oxidative stress and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2009; **610**: 119–127.

**Chuang J.I., Mohan N., Meltz M.L., Reiter R.J.** Effect of melatonin of NF- $\kappa$ B DNA binding activity in rat spleen. *Cell Biol Int* 1996; **20**: 687-692.

**Cooper, K.H. Pollock, M.I., Martin R.P., White S.R., Linnerad A.C., Jackson A.S.** Physical fitness levels vs selected coronary risk factors. *Jama* 1976; **236**: 166-169.

**Córdova A., Álvarez-Mon M.** *Inmunidad y deporte*. Madrid: Gymnos 2001: 141-155.

**Crespo I., García-Mediavilla V., Almar M., González P., Sánchez-Campos S., Tuñón M.J., González-Gallego J.** Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and antioxidant enzymes in Chang Liver cells. *Food Chem Toxicol* 2008; **46**: 1555-1569.

**Cuzzocrea S., Reiter R.J.** Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; **426**: 1-10.

**Cuzzocrea S., Reiter R.J.** Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem* 2002; **2**: 153-165.

**De Filippis D., Iuvone T., Esposito G., Steardo L., Arnold G.H., Paul A.P., Joris G.M., Benedicte Y.W.** Melatonin reverses lipopolysaccharide-induced gastro-intestinal motility disturbances through the inhibition of oxidative stress. *J Pineal Res* 2008; **44**: 45–51.

**De la Fuente M.** La nutrición y el sistema inmunitario en el envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2002; **37**: 17-25.

**De Vries H.A.** Physiological effects of an exercise training regimen upon men aged 52 to 82. *J Gerontol* 1979; **25**: 325-336.

**Dela F., Vaag A.A.** Physical training in the treatment of type 2 diabetes. *Ugeskr Laeger* 2000; **162**: 2185-2189.

**Díaz-Guerra M.J.M., Velasco M., Martín-Sanz P., Bosca L.** Nuclear factor  $\kappa$ B is required for the transcriptional control of type II NO synthase in regenerating liver. *Biochem J* 1997; **326**: 791-797.

**Doi M., Shichiri M., Katsuyama K., Ishimaru S., Hirata Y.** Cytokine-activated Jak-2 is involved in inducible nitric oxide synthase expression independent from NF- $\kappa$ B activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002; **160**: 123-132.

**Donovan C.M., Brooks G.A.** Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. *Am J Physiol* 1993; **244**: 83-89.

**Dossumbekova A., Anghelina M., Madhavan S., He L., Quan H., Knobloch T, Agarwal S.** Biomechanical signals inhibit IKK activity to attenuate NF- $\kappa$ B transcription activity in inflamed chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 3284–3296.

**El-Bassiouny A.E., El Bassiouni N.E., Nosseir M.M., Zoheiry M.M., El Ahwany E.G., Salah F., Omran Z.S., Ibrahim R.A.** Circulating and hepatic Fas expression in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Medscape J Med* 2008; **10**: 130.

**Erren T.C., Reiter R.J., Piekarski C.** Light, timing of biological rhythms, and chronodisruption in man. *Naturwissenschaften* 2003; **90**: 485-494.



**Escames G., López L.C., Ortiz F., Ros E., Acuña-Castroviejo D.** Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* 2006; **41**: 1165-1173.

**Esrefoglu M., Gul M., Parlakpınar H., Acet A.** Effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester on testicular injury induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; **19**:365–372.

**Filippin L.I., Moreira A.J., Marroni N.P., Xavier R.M.** Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide* 2009; **21**: 157-163.

**Froelicker, V.F.** The hemodynamic effects of physical conditioning in healthy young men and middle-aged individuals and in coronary heart disease. *Academic Press New York* 1986; **67**: 63-77.

**Fu J.Y., Masferrer J.L., Seibert K., Raz A., Needleman P.** The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990; **265**: 16737-16740.

**Fujiwara M., Shibata M., Watanabe Y., Nikiwa T., Hirata F., Mizuno N., Hayaishi O.** Indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 1978; **253**: 6081.

**Galley H.F., Webster N.R.** The immune-inflammatory cascade. *Br J Anaesth* 1996; **77**: 11-16.

**Garcia X., Stein F.** Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006; **17**: 55-57.

**García-Mediavilla V., Crespo I., Collado P.S., Esteller A., Sánchez-Campos S., Tuñón M.J., González-Gallego J.** The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor  $\kappa$ B pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 2007; **557**: 221–229.

**Gerhardt W., Waidenstr M.J.** Creatine kinase B-Subunit activity in serum after immunohinhibition of M-Subunit activity. *Clin Chem* 1979; **25**: 1274-1280.

**Gilad E., Wong H.R., Zingarelli B., Virag L., O'Connor M., Salzman A.L., Szabo C.** Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *FASEB J* 1998; **12**: 685–693.

**Gleeson M.** Immune system adaptation in elite athletes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; **9**: 659-665.

**Gokhale R., Chandrashekara S., Vasanthakumar K.C.** Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes: an adaptive response. *Cytokine* 2007; **40**: 123-127.

**Gollnick O.** Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained men. *J Appl Physiol* 1983; **33**: 312-315.

**Gomez-Cabrera M.C., Borrás C., Pallardo F.V., Sastre J., Ji L.L., Viña J.** Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 2005; **15**: 113-120.

**Gomez-Cabrera M.C., Domenech E., Viña J.** Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 2008; **44**: 126-131.

**González-Gallego J, Sánchez P.S., Mataix J.** *Nutrición en el deporte. Ayudas ergogénicas y dopaje.* Madrid: Díaz de Santos; 2006.

**Griscavage J.M., Wilk S., Ignarro L.J.** Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 3308-3312.

**Gullestadd L., Aukrust P.** The cytokine network in heart failure: pathogenic importance and potential therapeutic targets. *Heart Fail Mon* 2001; **2**: 8-13.

**Halar, E.M.** Management of stroke risk factors during the process of rehabilitation Secondary stroke prevention. *Phys Med Rehabil Clin Nam* 1999; **10**: 839-850.

**Hardeland R., Poeggeler B.** Nonvertebrate melatonin. *J Pineal Res* 2003; **34**: 233-241.

**Hayakawa T., Matsuzawa A., Noguchi T., Takeda K., Ichijo H.** The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect* 2006; **8**: 1098-1107.

**Hayden M.S., West A.P., Ghosh S.** NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogene* 2006; **30**: 6758-6780.

**Henry Y., Lepoivre M., Drapier J.C., Ducrocq C., Boucher J.L., Guissani A.** EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993; **7**: 1124-1134.

**Hickson, R.C.** Reduced training duration effects on aerobic power, endurance, and cardiac growth. *J Appl Physiol* 1992; **53**: 225-228.

**Hinz B., Brune K., Pahl A.** Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E2 and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000a; **278**: 790-796.

**Hinz B., Brune K., Pahl A.** Prostaglandin E2 up-regulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2000b; **272**: 744-748.

**Hiraishi H., Terano A., Ota S.I.** Oxygen metabolite induced cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 1998; **376**: 40- 48.

**Hirata F., Hayaishi O., Tokuyama T., Senoh S.** In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* 1974; **249**: 1311-1313.

**Hollander J., Fiebig R., Gore M., Ookawara T., Ohno H., Ji L.L.** Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 2001; **442**: 426-434.

**Holloszy, J.O., Coyle E.F.** Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl. Physiol* 1994; **56**: 831-835.

**Horton J.W., Maass D.L., White J., Sanders B.** Myocardial inflammatory responses to sepsis complicated by previous burn injury. *Surg Infect (Larchmt.)* 2003; **4**: 363-377.

**Huang C.C., Tsai S.C., Lin W.T.** Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. *Exp Gerontol* 2008; **43**: 571-577.

**Israel A.** The IKK complex, an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B? *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 129-133.

**Jiménez-Jiménez R., Cuevas M.J., Garatachea N., Baldini M., Almar M., González-Gallego J.** Eccentric training impairs NF- $\kappa$ B activation and over-expression of inflammation-related genes induced by acute eccentric exercise in the elderly. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 313–321.

**Johe P.D., Osterud B.** The in vivo effect of melatonin on cellular activation processes in human blood during strenuous physical exercise. *J Pineal Res* 2005; **39**: 324–330.

**Junger W.G., Cardoza T.A., Liu F.C., Hoyt D.B., Goodwin R.** Improved rapid photometric assay for qualitative measurement of PMN migration. *J Immunol Methods* 1993; **160**: 73-79.

**Karagounis L.G., Yaspelkis B.B., Reeder D.W., Lancaster G.I., Hawley J.A., Coffey V.G.** Contraction-induced changes in TNF $\alpha$  and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2010; Doi 10.1007/s00421-010-1427-5.

**Keller P., Penkowa M., Keller C., Steensberg A., Fischer C.P., Giralt M., Hidalgo J., Pedersen B.K.** Interleukin-6 receptor expression in contracting human skeletal muscle: regulating role of IL-6. *FASEB J* 2005; **19**: 1181-1183.

**Kim E., Park H., Cha Y.S.** Exercise training and supplementation with carnitine and antioxidants increases carnitine stores, triglyceride utilization, and endurance in exercising rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2004; **50**: 335-343.

**Kireev R.A., Tresguerres A.C.F., Garcia C., Ariznavarreta C., Vara E., Jesus A.F.** Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. *J Pineal Res* 2008; **45**: 394-402.

**Kolios G., Petoumenos C., Nakos A.** Mediators of inflammation: production and implication in inflammatory bowel disease. *Hepato-gastroenterology* 1998; **45**:1601-1609.

**Komatsu H., Koo A., Ghadishah E., Zeng H., Kuhlenkamp J.F., Inova M.** Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver evidence for a role of superoxide free radicals. *Am J Physiol* 1992; **262**: 6669-6676.

**König D., Neubauer O., Nics L., Kern N., Berg A., Bisse E., Wagner K.H.** Biomarkers of exercise-induced myocardial stress in relation to inflammatory and oxidative stress. *Exerc Immunol Rev* 2007; **13**: 15-36.

**König D., Schumacher Y.O., Berg A., Dickhut H.H., Mair J.** Cardiac troponins in the assessment of myocardial injury following exercise in athletes. *Am J Med Sports* 2004; **6**: 177-182.

**Kucharczak J., Simmons M.J., Fan Y., Gelinas C.** To be, or not to be: NF- $\kappa$ B is the answer role of Rel/NF- $\kappa$ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2004; **23**: 8961-8982.

**Kvetnoy I.** Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; **1**: 92-96.

**Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.

**Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T.** Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 6348–6352.

**Lanone S., Manivet P., Callebert J., Launay J.M., Payen D., Aubier M., Boczkowski J., Mebazaa A.** Inducible nitric oxide synthase (NOS2) expressed in septic patients is nitrated on selected tyrosine residues: implications for enzymic activity. *Biochem J* 2002; **366**: 399-404.

**Larsen A., Aarstrand T., Kristiansen M., Haugland A.** Assessing the effect of exercise training men with heart failure: Comparison of maximal, submaximal and endurance exercise protocols. *Eur Heart J* 2001; **22**: 684-692.

**Lee M.Y., Kuan Y.H., Chen H.Y., Chen T.Y., Chen S.T., Hunag C.C., Yang I.P., Hsu Y.S., Wu T.S., Lee E.J.** Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res* 2007; **42**: 297–309.

**León A.S., Casal D., Jacobs D.** Effects of 2000 kcal per week of walking and stair climbing on physical fitness and risk factors for coronary heart disease. *J Cardiopulm Rehabil* 1996; **16**: 183:192.



**León J., Escames G., Rodríguez M.I., López L.C., Tapias V., Entrena A., Camacho E., Carrion M.D., Gallo M.A., Espinosa A., Tan D.X., Reiter R.J., Acuña-Castroviejo D.** Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem* 2006; **98**: 2023-2033.

**Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori W.** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; **80**: 2587-2592.

**Lezoualc'h F., Sparapani M., Behl C.** N-acetyl-serotonin (normelatoninin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Pineal Res* 1998; **24**: 168-178.

**Li J.H., Yu J.P., Yu H.G., Xu X.M., Yu L.L., Liu J., Luo H.S.** Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF- $\kappa$ B activation in rats with colitis. *Mediators Inflamm* 2005; **4**: 185–193.

**Li Q., Guo Y., Tan W., Ou Q., Wu W.J., Sturza D., Dawn B., Hunt G., Cui C., Bolli R.** Cardioprotection afforded by inducible nitric oxide synthase gene therapy is mediated by cyclooxygenase-2 via a nuclear factor  $\kappa$ B dependent pathway. *Circulation* 2007; **116**: 1577-1584.

**Libby P., Okamoto Y., Rocha V.Z., Folco E.** Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 2010; **74**: 213-220.

**Lim P.O., Rana B.S., Struthers A.D., Mc Donald T.M.** Exercise blood pressure correlates with the maximum heart rate corrected Q/T interval in hypertens. *Eur J Clin Nutr* 2001; **15**: 164-172.

**Lindström J., Ilanne-Parikka P., Peltonen M., Aunola S., Eriksson J.G., Hemiö K., Hämäläinen H., Härkönen P., Keinänen-Kiukaanniemi S., Laakso M., Louheranta A., Mannelin M., Paturi M., Sundvall J., Valle T.T., Uusitupa M., Tuomilehto J.** Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 2006; **368**: 1673-1679.

**Luiking Y.C., Engelen M.P., Deutz N.E.** Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; **13**: 97-104.

**Maass D.L., White J., Horton J.W.** IL-1 $\beta$  and IL-6 act synergistically with TNF- $\alpha$  to alter cardiac contractile function after burn trauma. *Shock* 2002; **18**: 360-366.

**Macías M., Rodriguez-Cabezas M.N., Reiter R.J., Osuna A., Acuña-Castroviejo D.** Presence and effects of melatonin in Trypanosome cruzi. *J Pineal Res* 1999; **27**: 86-94.

**Mackiewicz Z., Hukkanen M., Povilenaite D., Sukura A., Fonseca J.E., Virtanen I., Konttinen Y.T.** Dual effects of caspase-1, interleukin-1  $\beta$ , tumour necrosis factor  $\alpha$  and nerve growth factor receptor in inflammatory myopathies. *Clin Exp Rheumatol* 2003; **21**: 41-48.

**Majano P.L., Medina J., Zubía I., Sunyer L., Lara-Pezzi E., Madonado-Rodriguez A., López-Cabrera M., Moreno-Otero R.** N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J Hepatol* 2004; **40**: 632-637.

**Maldve R.E., Kim Y., Muga S.J., Fischer S.M.** Prostaglandin E2 regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors. *J Lipid Res* 2000; **41**: 873-881.

**Manna S.K., Aggarwal B.B.** Vesnarinone suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun kinase, and apoptosis. *J Immunol* 2000; **164**: 5815-5825.

**Markovitch D., Tyrrell R.M., Thompson D.** Acute moderate-intensity exercise in middle-aged men has neither an anti- nor proinflammatory effect. *J Appl Physiol* 2008; **105**: 260–265.

**Márquez L.A., Dunford H.B., Wart H.V.** Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5666-5670.

**Martínez-Flores S., Gutiérrez-Fernández B., Sánchez-Campos S., González-Gallego J., Tuñon M.J.** Quercetin prevents nitric oxide production and nuclear factor  $\kappa$ B activation in interleukin-1 $\beta$  activated rat hepatocytes. *J Nutr* 2005; **135**: 1359–1365.

**Mathur N., Pedersen B.K.** Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm* 2008; doi:10.1155/2008/109502.

**Matthews J.R., Botting C.H., Panico M., Morris H.R., Hay R.T.** Inhibition of NF- $\kappa$ B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 2236-2242.

**Mazepa R.C., Cuevas M.J., Collado P.S., Gonzalez-Gallego J.** Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci* 2000; **66**: 153-160.

**Mbonye U.R., Song I.** Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. *BMB Rep* 2009; **42**: 552-560.

**McCord C.O., Allen E.P.** Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917; **23**: 207.

**McLachlan C., Mossop P.** Are elevations of N-terminal probrain natriuretic peptide in endurance athletes after prolonged strenuous exercise due to systemic inflammatory cytokines? *Am Heart J* 2006; **152**: 1.

**Melanson S.E., Green S.M., Wood M.J., Neilan T.G., Lewandrowski E.L.** Elevation of myeloperoxidase in conjunction with cardiac-specific markers after marathon running. *Am J Clin Pathol* 2006; **126**: 888-893.

**Menéndez-Peláez A., Howes K.A., Gonzalez-Brito R.J., Reiter R.J.** N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-o-methyltransferase activity and melatonin levels in the Harderian glands of the female syrian hamster: changes during the light: dark cycle and the effect of 6-parachloro-phenylalanine administration. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **145**: 1231-1238.

**Menéndez-Peláez A., Reiter R.J.** Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localisation. *J Pineal Res* 1993; **15**: 59-69.

**Mocatta, T.J., Pilbrow A.P., Cameron V.A., Senthilmohan R., Frampton C.M., Richards A.M., Winterbourn C.C.** Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**: 1993-2000.

**Mochizuki M, Shigemura H, Hasegawa N.** Anti-inflammatory effect of enzymatic hydrolysate of corn gluten in an experimental model of colitis. *J Pharm Pharmacol* 2010; **62**: 389-392.

**Moldeveanu A.L., Shepard R.J., Shek P.N.** The cytokines response to physical activity and training. *Sports Med* 2001; **31**: 115-144.

**Moncada S., Higgs A.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; **329**: 2002-2012.

**Morozov V.I., Tsyplenkov P.V., Goldberg N.D., Kalinski M.I.** The effects of high intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. *Eur J Appl Physiol* 2006; **97**: 716-722.

**Mundal R. Kjeldsen S.E., Sandvik L., Erikssen J.** Exercise blood pressure predicts mortality from myocardial infarction hypertension. *Am J Med* 1996; **27**: 324-329.

**Murray D.R., Freeman G.L.** Proinflammatory cytokines predictors of a failing heart? *Circulation*. 2003; **107**: 1460-1462.

**Nagaraju K., Raben N., Merritt G., Loeffler L., Kirk K., Plotz P.** A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. *Clin Exp Immunol* 1998; **113**: 407-414.

**Nathan C., Xie Q.W.** Nitric oxide synthase: roles, tolls and controls. *Cell* 1994; **78**: 915-918.

**Nicklas B.J., Hsu F.C., Brinkley T.J., Church T., Goodpaster B.H., Kritchevsky S.B., Pahor M.** Exercise training and plasma C-reactive protein and interleukin-6 in elderly people. *J Am Geriatr Soc* 2008; **56**: 2045-2052.

**Niebauer J.** Effects of exercise training on inflammatory markers in patients with hearth failure. *Heart Fail Rev* 2008; **13**: 39–49.

**Nielsen O.H., Rask-Madsen J.** Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; **216**: 149-59.

**Nieman D.C.** Infecção e o sistema imunológico. En: *Exercício e saúde*. São Paulo: Manole; 1999: 155-167.

**Nieman D.C., Nehlsen-Cannarella S.L.** The effects of acute and chronic exercise on immunoglobulins. *Sports Med* 1991; **11**: 183-201.

**Nocon M., Hiemann T., Müller-Riemenschneider F., Thalau F., Roll S., Willich S.N.** Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008; **15**: 239-246.

**Núñez-Naveira L., Montero-Martínez C., Ramos-Barbón D.** Oxidación, inflamación y modificaciones estructurales. *Arch Bronconeumol* 2007; **43**: 18-29.

**Palombo J.D., Blackburn G.L., Forse R.A.** Endothelial cell factors and response to injury. *Surgery* 1991; **173**: 505-519.

**Pang Q., Dou L., Pan X., Zeng S., He J., Xu W., Zeng Y.** Methylene chloride protects against cecal ligation and puncture-induced acute lung injury by modulating inflammatory mediators. *Int Immunopharmacol* 2010; doi:10.1016/j.intimp.2010.05.004.

**Pang S.F., Yu H.S., Suen H.C., Brown G.M.** Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol* 1980; **87**: 89-93.

**Paolone A.M., Lewis R.R., Lanigan W.T., Goldstein M.J.** Results of two years of exercise training in middle-aged men. *Phys Sportsmed* 1976; **4**: 64-69.

**Park S.K., Lin H.L., Murphy S.** Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF- $\kappa$ B binding to DNA. *Biochem J* 1997; **322**: 609-613.

**Pattengale P.K., Holloszy J.O.** Augmentation of skeletal muscle myoglobin by programs of treadmill running. *Am J Physiol* 1987; **36**: 783-787.

**Paulus W.J.** Cytokines in heart failure. *Heart Fail Monit* 2000; **1**: 505-506.

**Pedersen B.K., Akerström T.C., Nielsen A.R., Fischer C.P.** Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* 2007; **103**: 1093-1098.

**Pedersen B.K., Febbraio M.** Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 2008; **88**: 1379-1406.

**Pedersen B.K., Hoffman-Goetz L.** Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1055-1081.



**Pedersen B.K., Rohde T., Ostrowski K.** Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol Scan* 1998; **162**: 325-332.

**Pedersen B.K., Saltin B.** Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports* 2006; **16**: 63.

**Pedersen B.K., Steensberg A., Keller P., Keller C., Fischer C., Hiscock N., Van Hall G., Plomgaard P., Febbraio M.A.** Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch* 2003; **446**: 9-16.

**Petersen A.M., Pedersen B.K.** The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005; **98**: 1154-1162.

**Petersen A.M., Plomgaard P., Fischer C.P., Ibfelt T., Pedersen B.K., Hall G.** Acute moderate elevation of TNF-alpha does not affect systemic and skeletal muscle protein turnover in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 294-299.

**Petridou A., Chatzinikolaou A., Fatouros I., Mastorakos G., Mitrakou A., Chandrinou H., Papassotiriou I., Mougios V.** Resistance exercise does not affect the serum concentrations of cell adhesion molecules. *Br J Sports Med* 2007; **41**: 76-79.

**Pierce M., Harding D., Ridout D., Keen H., Bradley C.** Risk and prevention of type 2 diabetes: offepring's views. *Br J Gen Pract* 2001; **51**: 194-199.

**Post A., Holsboer F., Behl C.** Induction of NF- $\kappa$ B activity during haloperidol-induced oxidative toxicity in clonal hippocampal cells: suppression of NF- $\kappa$ B and neuroprotection by antioxidants. *J Neurosci* 1998; **18**: 82-46.

**Prabhu, S.D.** Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res* 2004; **95**: 1140-1153.

**Prasad K., Kalra J., Chaudhary A.K., Pharm M., Debnath D.** Effect of polymorphonuclear leukocyte-derived oxygen free radicals and hypochlorous acid on cardiac function and some biochemical parameters. *Am Heart J* 1990; **3**: 538-550.

**Prieto A., Reyes E., Álvarez-Mon M.** Activación de las subpoblaciones de linfocitos a sus funciones efectoras. *Medicine* 1997a; **51**: 2263-2267.

**Prieto A., Reyes E., Álvarez-Mon M.** Tolerancia y autoinmunidad. *Medicine* 1997b; **51**: 2303-2308.

**Qi W.N., Chaiyakit P., Cai Y., Allen D.M., Chen L.E., Seaber A.V., Urbaniak J.R.** NF- $\kappa$ B p65 involves in reperfusion injury and iNOS gene regulation in skeletal muscle. *Microsurgery* 2004; **24**: 316–323.

**Radford-Smith G., Jewell D.P.** Cytokines and inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996; **10**: 151-164.

**Reiter R.J.** Pineal gland: Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *TEM* 1991a; **2**: 13-19.

**Reiter R.J.** Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev* 1991b; **12**: 151-180.

**Reiter R.J., Calvo J.R., Karbownik M., Qi W., Tan D.X.** Melatonin and relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **917**: 376-86.

**Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czarnocki Z.** Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**: 1129-1146.

**Riddell M.C.** The endocrine response and substrate utilization during exercise in children and adolescents. *J Appl Physiol* 2008; **105**: 725-733.

**Rissanen A., Fogelholm M.** Physical activity in the prevention and treatment of other morbid conditions and impairments associated with obesity current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exercise* 1999; **31**: 635-645.

**Rodella L.F., Filippini F., Bonomini F., Bresciani R., Reiter R.J., Rezzani R.** Beneficial effects of melatonin on nicotine-induced vasculopathy. *J Pineal Res* 2010; **48**:126-132.

**Rodríguez M.I., Escames G., López L.C., López A., García J.A., Ortiz F., Acuña-Castroviejo D.** Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2007; **42**: 272–279.

**Rogler G., Andus T.** Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; **22**: 382-389.

**Roitt I.M., Brostoff J., Male D.** *Imunologia*. São Paulo: Manole 2003: 423.

**Roman J., Colell A., Blasco C., Caballeira J., Pares A., Rodes J., Fernández-Checa J.C.** Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HEP G2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B. *Hepatology* 1999; **30**: 1473-1480.

**Salie R., Harper I., Cillie C. Genade S., Huisamen B., Moolman J., Lochner A.** Melatonin protects against ischaemic–reperfusion myocardial damage. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**: 343–357.

**Salit M.** Exercise and immunity. En: Thomas. *Drugs, athletes and physical performance*. pp: 169. Plenum Medical Book Company. New York and London Plenum Publishing Corporation; 2003.

**Sasaki M., Jordan P., Takashi J., Itoh M., Jenkins M., Pavlick K., Minagar A., Alexander S.J.** Melatonin reduces TNF- $\alpha$  induced expression of MAdCAM-I via inhibition of NF- $\kappa$ B. *BMC Gastroenterol* 2002; **2**: 9-13.

**Sato Y.** Diabetes and life-style: role of physical exercise for primary prevention. *Br J Nutr* 2000b; **84**: 187-190.

**Sato Y.** Effects of physical activities on the type 2 diabetes. *Nippon Rinsho* 2000a; **58**: 385-390.

**Scheuer J.** Effects of physical training on myocardial vascularity and perfusion. *Circulation* 1992; **66**: 491-495.

**Serrano C., Valero A., Picado C.** Óxido nítrico nasal. *Arch Bronconeumol* 2004; **40**: 222-230.

**Sessa W.C., Pritchard K., Seyedi N., Wang J., Hintze T.H.** Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 1994; **74**: 349-353.

**Sewerynek E., Reiter R.J., Melchiorri D., Ortiz G.G., Lewinski A.** Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepato-Gastroenterology* 1996; **43**: 898-905.

**Smith C.W., Marlin S.D., Rothlein R., Toman C., Anderson D.C.** Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1989; **83**: 2008-2017.

**Smith J.A., Gray A.B., Pyne D.B., Baker M.S., Telford R.D., Weidemann M.J.** Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. *Am J Physiol* 1996; **39**: R838-R845.

**Smith L.L.** Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc* 2000; **32**: 317-331.

**Stefulj J., Hortner M., Ghosh M., Schauenstein K., Rinner I., Wolfler A., Semmler J., Liebmann P.M.** Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; **30**: 243-247.

**Straus D.S., Pascual G., Li M., Welch J.S., Ricote M., Hsiang C.H., Sengchanthalangsy L.L., Ghosh G., Glass C.K.** 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4844-4849.

**Szcepanik M.** Melatonin and its influence in immune system. *J Physiol Pharmacol* 2007; **58**: 115–124.

**Szmuskowicz A.W., Heinzelman R.V.** Synthesis of N-acetylmethoxytryptamine. *J Org Chem* 1960; **25**: 287.

**Takimoto E., Kass D.A.** Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* 2007; **49**: 241–248.

**Tan D.X., Hardeland R., Manchester L.C., Poeggeler B., Lopez-Burillo S., Sainz R.M., Mayo J.C., León J., Reiter R.J.** Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 2003; **34**: 249-259.

**Tan D.X., Manchester L.C., Burkhardt S., Seno S.** N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001; **15**: 2294-2296.

**Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Plummer C., Limson B.F., Wintraub S.T., Qi W.** Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**: 1177-1185.

**Tengattini S., Reiter R.J., Tan D.X., Terron M.P., Rodella L.F., Rezzani R.** Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 2008; **44**: 16–25.

**Terramot S.** Theoretical basis for usefulness in COPD patients. *Chest* 1998; **114**: 942-943.

**Testa M., Rocca B., Spath L., Ranelletti F.O., Petrucci G., Ciabattini G., Naro F., Schiaffino S., Volpe M., Reggiani C.** Expression and activity of cyclooxygenase isoforms in skeletal muscles and myocardium of humans and rodents. *J Appl Physiol* 2007; **103**: 1412–1418.

**Thorstensson A.** Effect of strength training on enzyme activities and fiber characteristics in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1992; **96**: 392-395.

**Timmerman K.L., Flynn M.G., Coen P.M., Markofski M.M., Pence B.D.** Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+, CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol* 2008; **84**: 1271-1278.

**Timmons B.W.** Paediatric exercise immunology: health and clinical applications. *Exerc Immunol Rev* 2005; **11**: 108-144.

**Timmons B.W., Tarnopolsky M.A., Snider D.P., Bar-Or O.** Immunological changes in response to exercise: influence of age, puberty, and gender. *Med Sci Sports Exerc* 2006; **38**: 293-304.

**Timmons B.W., Hamadeh M.J., Tarnopolsky M.A.** Two methods for determining plasma IL-6 in humans at rest and following exercise. *Eur J Appl Physiol* 2009; **105**: 13-18.

**Toda N., Ayajiki K., Okamura T.** Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev* 2009; **61**: 62-97.

**Torres S.H., De Sanctis J.B., Bricen M.L., Hernández N., Finol H.J.** Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 2004; **181**: 419–427.

**Tuñón M.J., Garcia-Mediavilla M.V., Sánchez-Campos S., González-Gallego J.** Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Curr Drug Metab* 2009; **10**: 256–271.

**Vila del Sol V., Díaz-Muñoz M.D., Fresno M.** Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 272-283.

**Vuori I., Oja P., Cavill., Coumans B.** La Actividad Física para la Salud. *Boletín de la Federación Española de Medicina del Deporte* 2000; **6**: 1-6.



**Wallace J.L., Miller M.J.S.** Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 2000; **119**: 512-520.

**Wang J., Wolin M.S., Hintze T.H.** Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ Res* 1993; **73**: 829-838.

**Ward C., Chilvers E.R., Lawson M.F.** NF- $\kappa$ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem* 1999; **274**: 4309-4318.

**Weissbach H., Redfield B.G., Axelrod J.** Biosynthesis of melatonin: enzymatic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim Biophys Acta* 1960; **43**: 352-353.

**Whyte G.P.** Clinical significance of cardiac damage and changes in function after exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2008; **40**: 1416-1423.

**Witkowska A.M.** Soluble ICAM-1: a marker of vascular inflammation and lifestyle. *Cytokine* 2005; **31**:127-34.

**Woo J.** Relations hips among diet, physical activity and other lifestyle factors and debilitating diseases in the elderly. *Eur J Clin Nutr* 2000; **54**: 43-47.

**Xie W.L., Chipman J.G., Robertson D.L., Erikson R.L., Simmons D.L.** Expression of a mitogen responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2692-2696.

**Yentis S.M.** Cytokines and sepsis: time for reappraisal. *Br J Anaesth* 1995; **74**: 119-120.

**Zamanian-Daryoush M, Mogensen TH.** NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1278-1290.

**Zerfaoui M., Suzuki Y., Naura A.S., Hans C.P., Nichols C., Boulares A.H.** Nuclear translocation of p65 NF-kappaB is sufficient for VCAM-1, but not ICAM-1, expression in TNF stimulated smooth muscle cells: Differential requirement for PARP-1 expression and interaction. *Cell Signal* 2008; **20**: 186-194.

**Zhang R., Brennan M.L., Fu X., Aviles R.J., Pearse G.L., Penn M.S.** Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; **286**: 2136-2142.