

UNIVERSIDAD DE CUENCA



Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Estudios Ambientales (CEA)

Maestría en Toxicología Industrial y Ambiental Segunda

Cohorte

“Riesgo toxicológico por estrés oxidativo en deportistas de alto nivel de la ciudad de Cuenca”

Tesis previa obtención
del título de Máster en
Toxicología Industrial y
Ambiental

AUTORA: Dra. Liliana Elizabeth Uyaguari Ocaña C.I. 0102925401

DIRECTOR: Dr. Fausto Leonardo Zaruma Torres, PhD C.I. 1102127980

CUENCA - ECUADOR

2018



RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar si la concentración de malondialdehído (MDA) representa un marcador ideal de estrés oxidativo, además se midió la concentración de creatinfosfoquinasa total (CPK-NAC) y deshidrogenasa láctica total (LDH), como marcador de desgaste muscular.

Este fue un estudio piloto que se realizó en 30 atletas de la ciudad de Cuenca, 10 alto nivel y 20 atletas fueron el grupo control, es decir que entrenan de manera regular pero con menor intensidad.

La determinación del malondialdehído se realizó por el método de Okawa y Asakawa modificados que se basa en la reacción del MDA con el ácido-2-tiobarbitúrico y las enzimas por un método cinético.

Como resultados se encontró que en los tres parámetros medidos existen diferencias significativas $p=0.001$ entre el grupo de alto nivel y el grupo control, la mediana de la CPK en el grupo de alto nivel fue de 337.70 U/L (282.6-669.52) y en el grupo control 225.25 U/L (107.62-275.27), la concentración de la mediana de la LDH en el grupo de alto nivel fue de 478.80 U/L (359.52-531.92) y en el grupo control 340.00 U/L (309.57-384.52). En cuanto al malondialdehído las concentraciones encontradas fueron 2.93 (0.92-5.65) μM del grupo control y 6.92 (5.09-11.34) μM en el grupo de alto nivel. Si mostró diferencias significativas $p=0.0001$. Finalmente se consideró que la medida del MDA, CPK y LDH sería un buen parámetro para asociar con el estrés oxidativo en personas con alta demanda energética como los deportistas de alta competición.

PALABRAS CLAVE.

Atletas de Alto Nivel, Radicales Libres, Estrés Oxidativo, Malondialdehído, Creatinquinasa, Deshidrogenasa Láctica.



ABSTRACT

The objective of this study was to determine if the concentration of malondialdehyde (MDA) represents an ideal marker of oxidative stress, in addition the concentration of total creatinphosphokinase (CPK-NAC) and total lactic dehydrogenase (LDH) was measured as a marker of muscle wasting.

This was a pilot study that was conducted in 30 athletes from the city of Cuenca, 10 high level and 20 athletes were the control group, meaning they train regularly but with less intensity.

The determination of malondialdehyde was performed by the modified Okawa and Asakawa method which is based on the reaction of MDA with 2-thiobarbituric acid and enzymes by a kinetic method.

As results we found that in the three parameters measured there are significant differences $p = 0.001$ between the high-level group and the control group, the median of the CPK in the high-level group was 337.70 U / L (282.6-669.52) and in the control group 225.25 U / L (107.62-275.27), the median concentration of LDH in the high-level group was 478.80 U / L (359.52-531.92) and in the control group 340.00 U / L (309.57). -384.52). As for malondialdehyde, the concentrations found were 2.93 (0.92-5.65) μM of the control group and 6.92 (5.09-11.34) μM in the high-level group. If it showed significant differences $p = 0.0001$. Finally, it was considered that the measurement of MDA, CPK and LDH would be a good parameter to associate with oxidative stress in people with high energy demand as high competition athletes.

KEYWORDS

High Level Athletes, Free Radicals, Oxidative Stress, Malondialdehyde, Creatine Kinase, Lactic Dehydrogenase.



ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS:.....	7
INDICE DE ANEXOS.....	7
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	8
CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	10
CLÁUSULA DE DERECHO DE AUTOR	11
AGRADECIMIENTO	12
DEDICATORIA	13
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES.....	16
OBJETIVOS	17
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.	17
Objetivo general:.....	17
Objetivos específicos:	17
CAPÍTULO I	18
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 EL DEPORTE.....	18
1.1.1 Beneficios del deporte	18
1.1.2 Deportistas de alto nivel	18
1.2 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	19
1.2.1 Radicales libres (ROS).....	19
1.2.1.1...Mecanismos de formación de los radicales libres.....	21
1.2.1.2 Fuentes endógenas de ROS.....	21
1.2.1.3 Fuentes exógenas de radicales libres.....	22
1.2.1.4 Formación de ROS en el deporte.....	23
1.2.2 Estrés oxidativo	24
1.2.2.1 Estrés oxidativo y el deporte.....	25
1.2.2.2 Estrés oxidativo y efectos sobre la salud.....	26
1.2.2.3 Daño a las proteínas.....	27
1.2.2.4 Efectos sobre el ADN.....	27



1.2.2.5 Daño producido sobre los lípidos (peroxidación lipídica).....	28
1.3 MECANISMO ANTIOXIDANTE	29
1.3.1 Sistemas de defensa biológica contra los RL.....	29
1.3.2 Alimentos que contienen antioxidantes.....	30
1.4 MARCADORES BIOLÓGICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	31
1.4.1 Proteínas carboniladas	32
1.4.2 ADN.....	32
1.4.3 Homocisteína.....	32
1.4.4 Glutación	32
1.4.5 Malondialdehído (MDA).....	33
1.4.6 Creatínfosfoquinasa (CPK).....	33
1.4.7 Deshidrogenasa Láctica	36
CAPITULO II.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1 Tipo de estudio	38
2.2 Muestra	38
2.3 Criterios de inclusión y exclusión	38
2.4 Técnica de recolección de datos.....	39
2.5 Método de análisis de las variables	39
2.6 Materiales.....	39
2.7 Equipos	39
2.8 Reactivos.....	40
2.9 Procedimiento.....	40
2.9.1 Preanálisis.....	40
2.9.2 Análisis de laboratorio	41
2.9.2.1 Determinación de creatínfosfoquinasa (CPK).....	41
2.9.2.1.1 Fundamento del método.....	41
2.9.2.1.2 Preparación de reactivos.....	42
2.9.2.1.3 Técnica.....	42
2.9.2.1.4 Cálculos.....	43
2.9.2.1.5 Valores normales.....	43
2.9.2.2 Determinación de la Deshidrogenasa láctica.....	43
2.9.2.2.1 Fundamento del método.....	43
2.9.2.2.2 Preparación de reactivos.....	44



2.9.2.2.3	Técnica.....	44
2.9.2.2.4	Cálculos.....	44
2.9.2.2.5	Valores normales.....	44
2.9.2.3	Determinación de Malondialdehído.....	44
2.9.2.3.1	Fundamento del método.....	44
2.9.2.3.2	Preparación de reactivos.....	45
2.9.2.3.3	Curva de calibración.....	45
2.9.2.3.4	Técnica.....	45
2.9.2.3.5	Cálculos.....	46
2.10	Análisis estadístico	46
2.11	Consideraciones éticas.....	47
2.12	Interpretación de resultados	47
CAPÍTULO III		48
RESULTADOS		48
3.1	Análisis descriptivo de la muestra.....	48
3.2	Curva de calibración del MDA	48
3.3	Resultados obtenidos	49
3.4	Análisis estadístico	50
3.4.1	Correlación de Pearson	50
3.4.2	Comparación entre los dos grupos	52
3.4.2.1	Comparación de las medianas del MDA.....	52
3.4.2.2	Comparación de las medianas del CPK de los dos grupos.....	53
3.4.2.3	Comparación de las medianas de la LDH de los dos grupos.....	54
DISCUSIÓN.....		55
CONCLUSIONES		57
RECOMENDACIONES.....		58
BIBLIOGRAFÍA Y OTRA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA CITADA.		60
ANEXOS		66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1, Clasificación de los radicales libres	21
Tabla 2. Fuentes exógenas que promueven el aumento de radicales libres..	22



Tabla 3. Efectos patológicos del estrés oxidativo en los diferentes órganos	28
Tabla 4. Alimentos que contienen antioxidantes	31
Tabla 5. Descripción de la metodología usada para la determinación de las variables analizadas en la presente investigación.....	39
Tabla 6. Caracterización de la muestra.....	48
Tabla 7. Resultados grupo Alto nivel.....	49
Tabla 8. Resultados grupo control	50

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Factores de riesgo asociados al ejercicio.....	25
Figura 2. Daño de los ROS en la célula	27
Figura 3. Lugar específico donde actúa cada antioxidante	30
Figura 4. Aducto cromógeno MDA-TBA.....	33
Figura 5. Reacción que cataliza la CPK	34
Figura 6. Oxidación reversible de lactato a piruvato.....	36
Figura 7. Reacciones de reducción del NADP a NADPH.....	42
Figura 8. Reacción de oxidación del NADH a NAD	43
Figura 9. Curva de Calibración del MDA.....	49
Figura 10. Correlación de Pearson en el grupo de alto nivel.....	50
Figura 11. Correlación de Pearson en el grupo control	51
Figura 12. Correlación de Pearson.....	51
Figura 13. Comparación de las medianas de la MDA entre los dos grupos	52
Figura 14. Contraste de Hipótesis del MDA	52
Figura 15. Comparación de las medias de la CPK entre los dos grupos.....	53
Figura 16. Contraste de Hipótesis del CPK.....	53
Figura 17. Comparación de las medias de la LDH entre los dos grupos	54
Figura 18. Contraste de Hipótesis del LDH	54

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado.....	66
Anexo 2. Encuesta para la clasificación de los deportistas que participan en el estudio de acuerdo a su intensidad de entrenamiento.....	68
Anexo 3. Curva de calibración del MDA.....	69
Anexo 4. Flujograma de procedimiento para el análisis de MDA, CPK, LDH...70	
Anexo 5. Materiales, equipos y reactivos que se usarán en el estudio.....	71



Anexo 6. Características demográficas, epidemiológicas y clasificación de los atletas que participan en el estudio de acuerdo a su intensidad de entrenamiento, además de la concentración de MDA, CK y DHL.	72
Anexo 7. Registro fotográfico.....	73
Anexo 8. Inserto del reactivo de MDA.....	79
Anexo 9. Inserto del reactivo de CPK	87
Anexo 10. Inserto del reactivo de LDH.....	88
Anexo 11. Certificado del INSPI.....	89
Anexo 12. Informe de resultados del MDA.....	90
Anexo 13. Resultados de enzimas.....	91

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina-5- difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BHT	Butil hidroxitolueno
-CH ₂ ⁻	Grupo metilo
CP	Creatina fosfato
CPK	Creatinfosfoquinasa
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EO	Estrés oxidativo
ESR	Electrón spin resonance
GHS	Glutación
GCMS	Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas
HK	Hexoquinasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO ₂	Hidroperoxilo



HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
LDH	Deshidrogenasa láctica
MAO	Monoamino oxidasa
MDA	Malondialdehído
NA	Noradrenalina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NO ⁻	Óxido nítrico
NO ₃ ⁻	Peroxinitrito
O ₂	Oxígeno
OH ⁺	Radical hidroxilo
RL	Radicales libres
RO ⁻	Radical alcoxilo
ROOH	Hidroperoxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
XO	Xantino oxidasa
μMol /l	Micromoles por litro



Cláusula de Propiedad Intelectual

Liliana Elizabeth Uyaguari Ocaña, autora del trabajo de titulación “Riesgo toxicológico por estrés oxidativo en deportistas de alto nivel de la ciudad de Cuenca”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de Noviembre del 2018

Liliana Elizabeth Uyaguari Ocaña

C.I: 0102925401



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Liliana Elizabeth Uyaguari Ocaña en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Riesgo Toxicológico en deportistas de alto nivel de la ciudad de Cuenca", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de Noviembre del 2018

Liliana Elizabeth Uyaguari Ocaña

C.I: 0102925401



AGRADECIMIENTO

A mis padres por todo el apoyo brindado en todos los proyectos que emprendo.

A mis hijos porque a pesar de su corta edad supieron respetar y entenderme que a veces el tiempo se acortaba al tener que cumplir con las responsabilidades de la maestría.

Un sincero agradecimiento al director de este proyecto Dr. Fausto Zaruma Torres, por su colaboración en todo momento, por guiarme hasta poder culminar con éxito este trabajo de titulación.

Agradezco a los profesores Lcdo. Luis Chocho y Lcdo. Rolando Figueroa por el apoyo brindado durante este estudio para la toma de muestra, y a mis amigos deportistas por supuesto por su colaboración.

A todos los profesionales que laboran en el INSPI- Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, CZ6 por permitirme usar las instalaciones y los equipos para realzar la práctica del estudio.

Un agradecimiento a mis queridas amigas Mary y Vivi por su ayuda en algunos aspectos de este trabajo.

Un sueño es un sueño. Una meta es un sueño con un plan y una fecha tope.-Harvey Mackay.



DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres por ser el pilar fundamental para mi desarrollo tanto académico como de otros aspectos de mi vida, quienes siempre me han demostrado su apoyo incondicional.

A mi esposo Pablo por su apoyo y comprensión durante todo el desarrollo de este proyecto.

A mis hijos Karlita y Pablito quienes me impulsan a superarme para poder brindarles lo mejor de mí, que me apoyaron durante el desarrollo de esta maestría.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos porque ellos también hacen parte de los momentos especiales de mi vida.



INTRODUCCIÓN

El presente estudio planteó el análisis del estrés oxidativo en deportistas de alto nivel comparándolos con deportistas que entrenan de manera regular y con una menor intensidad, se realizó la cuantificación de CK y DHL, como parámetros de destrucción muscular y MDA, como parámetro de estrés oxidativo.

Hay evidencia que durante el ejercicio exhaustivo se producen radicales libres que superan a los mecanismos sistémicos de defensa antioxidante, lo que se conoce como estrés oxidativo (Bonilla, 2005). Un radical libre (ROS) es una especie química definida, que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados y se caracteriza por su elevada reactividad (Núñez, 2011). De un 4 a 5% del oxígeno formará ROS (Del Castillo, 2000). Los lípidos por poseer dobles puentes de hidrógeno, son susceptibles de la oxidación. Los ROS inician y causan la peroxidación de lípidos, particularmente aquellos de la membrana celular (Sánchez, 2011). En 1978 se demostró por primera vez que el ejercicio físico podía conducir a un incremento en la peroxidación lipídica (Luciano, 2013). Este aumento puede ser directamente proporcional a la intensidad de la actividad deportiva (Marrugat et al, 2009), debido a un incremento en el consumo de oxígeno y al daño muscular (Corrales, 2009). Laranza et al, en el 2016 estudiaron 22 atletas de alto rendimiento, concluyendo que existen modificaciones bioquímicas relacionadas con la carga de entrenamiento.

El daño que los ROS provocan en los diferentes tejidos se debe a que ellos reaccionan químicamente con los lípidos, proteínas, carbohidratos y el ADN (Luciano, J. M. 2013). Los cambios en los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo, están asociados al envejecimiento y a enfermedades cardiovasculares, renales, etc. (Corrales, 2009). Los ROS más conocidos son el superóxido y el hidroxilo (García, 2012). Atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas, transformándolos en ácido grasos peroxidados (Laranza et al, 2016), los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando malondialdehído (MDA) que es altamente tóxico (Muñiz et al, 2016), ya que puede combinarse con grupos amino de proteínas, sobre todo de lisina y producir aductos de proteínas modificadas,



que son inmunogénicas. Como resultado se producen anticuerpos contra estas lisinas modificadas, que están relacionados con la aterosclerosis, insuficiencia arterial coronaria y el infarto al miocardio (Tsikas et al, 2005). La cuantificación de MDA es proporcional a los ácidos grasos oxidados y por lo tanto es un buen indicador de peroxidación lipídica. Esta última provoca cambios de fluidez, aumento de permeabilidad, disminución del potencial de la membrana celular que pueden llevar a la muerte celular (Muñiz et al, 2016).

La producción de ROS en el ejercicio físico, dependerá entre otros factores de la intensidad, duración, el tipo de contracción muscular y las condiciones ambientales, como dieta, altura y temperatura (Fernández et al, 2009).

Considerando estas condiciones externas, Cuenca posee un peligroso nivel de radiación ultravioleta debido al daño en la capa de ozono y por su ubicación geográfica, por lo tanto, habrá horas del día de intenso calor (Monitor Nacional de Radiación Ultravioleta, 2018). En tal virtud, los deportistas que entrenan en condiciones climáticas adversas y sin una adecuada reposición hídrica, serían más propensos a producir una mayor cantidad de ROS, lo cual contribuiría a un mayor desequilibrio redox.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo entre personas sanas que practican deporte moderado como grupo control y deportistas de alto nivel. Para ello se tomó muestras de sangre y se cuantificó el marcador biológico de estrés oxidativo, malondialdehído (MDA), y las enzimas Deshidrogenasa Láctica total (LDH) y Creatinfosfoquinasa total (CPK).



ANTECEDENTES

En 1978 se demostró por primera vez que el ejercicio físico podía conducir a un incremento en la peroxidación lipídica, se observó un aumento de 1.8 veces el nivel de pentano exhalado, un subproducto de la peroxidación lipídica, después de 60 minutos de bicicleta (Dillard et al, 1978). Desde entonces se han acumulado crecientes evidencias que sostienen la hipótesis de que la actividad física tiene el potencial de aumentar la producción de radicales libres y conducir al estrés oxidativo.

En otro estudio reporta que; bajo circunstancias normales de alimentación, las personas que entrenan por tiempo prolongado aumentan de manera significativa sus reservas de antioxidantes en los tejidos respecto de quienes no lo hacen, y con el paso del tiempo los atletas tienen concentraciones menores de lipoperóxidos sanguíneos ya que sus músculos demuestran un grado más eficiente de oxigenación, un manejo metabólico del ácido láctico y un aumento importante en la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, tanto en los tejidos como en los eritrocitos (Clarkson, 2009).

McAnulty et al, (2005) hallaron una mayor concentración de F-isoprostanos en plasma, que es indicador de peroxidación lipídica, en un grupo de individuos sanos que se ejercitaron aeróbicamente en condiciones de calor hasta llegar a los 39.5 °C, comparado con un grupo control que se ejercitaba en un ambiente térmicamente neutro, a 25 °C., se observó también una mayor acumulación de lactato en las personas que entrenaron en condiciones de calor.

Investigaciones en humanos examinaron el efecto del ejercicio intenso sobre las concentraciones de antioxidantes en la sangre y los tejidos. Así las personas que corren la maratón sin el entrenamiento correcto, aumentan de manera importante el grado de lipoperoxidación en la sangre, en comparación con los maratonistas profesionales cuyos lipoperóxidos sanguíneos no se modifican significativamente durante y después de la prueba (Salinas, 2007).



En el 2016 se realizó un estudio con 22 atletas de alto rendimiento de béisbol, se cuantificó CPK, MDA, se concluyó que existen modificaciones bioquímicas asociadas al daño muscular inducido por la carga de entrenamiento. La enzima CPK mostró un incremento significativo, como indicador de daño muscular. En cuanto al MDA no se encontró diferencias significativas con el grupo control (Laranza et al, 2016).

Se realizó otro estudio con el objetivo de saber el comportamiento del malondialdehído (MDA), a grandes altitudes (4200 m de altitud). La media de concentración de MDA fue de 4,2 $\mu\text{mol/L}$. El valor de la media encontrada es mayor que los referidos para el nivel del mar y supone la influencia de la hipoxia sobre los valores del MDA (Pomar et al, 2017).

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.

Objetivo general:

Evaluar el estrés oxidativo en los atletas de alto rendimiento de la ciudad de Cuenca.

Objetivos específicos:

- Determinar la concentración de malondialdehído en sangre, como biomarcador de estrés oxidativo, en atletas de alto nivel de Cuenca y en un grupo control.
- Determinar la concentración de la enzima CPK total en la sangre de atletas de alto rendimiento en Cuenca y de un grupo control.
- Determinar la concentración de la enzima DHL total en la sangre de atletas de alto rendimiento en Cuenca y de un grupo control.



CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 EL DEPORTE

1.1.1 Beneficios del deporte

Los beneficios que provienen de la práctica regular del ejercicio físico, son conocidos ampliamente, entre ellos tenemos el aumento del tono muscular, pérdida de peso, mejoría funcional de aparato cardiovascular, aumento del metabolismo energético y de las defensas antioxidantes, aumento de la fuerza y de la resistencia y disminución de la osteoporosis, entre otros, aunque también existe evidencia de que durante el ejercicio aeróbico y anaeróbico, se produce un incremento en la producción de radicales libres (González & García, 2012).

1.1.2 Deportistas de alto nivel

Se consideran atletas de alto nivel a los deportistas que ejecutan sesiones de entrenamiento cuya duración no sea menor a dos horas al día, cinco veces a la semana (Cerrada et al, 2016). Los atletas de mediano rendimiento que son los que entrenan de una a dos horas, hasta tres veces por semana (Cerrada et al, 2016). El deporte de alto nivel le exige al deportista obtener buenos resultados además de una rápida recuperación luego de las competencias. Cuando no existe esta adecuada estrategia entrenamiento – competencia - recuperación y sumada a una alimentación de mala calidad, los deportistas pueden llegar a experimentar una fatiga crónica, que está en estrecha relación con el estrés oxidativo (Sandoval, 2003).

Los efectos del ejercicio intenso sobre el sistema inmunológico pueden agotar las defensas, cuando actúa de forma crónica. La falta de descanso conduce a la rabdomiólisis, que es la destrucción fisiológica de cierto porcentaje de células musculares (Sandoval, 2003). El daño muscular está acompañado de un estado inflamatorio, que conduce a una disminución de la fatiga muscular con la liberación de enzimas musculares (CPK, LDH), cambios histológicos y dolor. Esto es una alerta y un mecanismo de defensa (Barranco, 2013).



Cuando se realiza ejercicio se forman radicales libres, durante la oxidación de hemoglobina y mioglobina debido a la inflamación muscular, autooxidación de las catecolaminas, por una mala alimentación con una limitada cantidad de antioxidantes, deficiente hidratación, y las condiciones ambientales como frío, calor y contaminación (Fernández et al, 2009), por lo tanto es mayor el requerimiento de mecanismos de defensa antioxidante. Algunas de las defensas antioxidantes se adecúan con el entrenamiento, pero pueden ser superadas cuando se excede el nivel de ejercicio al cuál se han adaptado, generando un estado de estrés oxidativo (González & García, 2012).

1.2 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

1.2.1 Radicales libres (ROS)

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, tienen una vida media muy corta, desde milisegundos a nanosegundos (Fernández et al, 2009). Una vez que el ROS ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre al quedar con un electrón desapareado, así se inicia una verdadera reacción en cadena que destruye las células ya que tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello & Suwalsky, 2006).

Los ROS cumplen una función importante en algunos procesos básicos de la vida como son la diferenciación o limitación del crecimiento celular y la apoptosis (González & García, 2012), algunos se generan de forma normal y continua en el organismo resultado de procesos celulares como el relacionado con el metabolismo oxidativo de la mitocondria, que es necesario para la obtención de ATP (Corrales & Ariza, 2012). Están vinculados además con la defensa del organismo frente a agresores como virus, bacterias, parásitos y células anormales (Avello & Suwalsky, 2006).



Este proceso de generación de radicales libres debe ser controlado por moléculas antioxidantes, que son capaces de neutralizar la acción oxidante del radical libre, si esto no sucede puede desarrollarse diversas patologías crónicas degenerativas, como enfermedades pulmonares, cardiovasculares, inmunológicas y neurodegenerativas (Galván et al, 2008). La reactividad y toxicidad de los radicales libres está también relacionada con el proceso de envejecimiento (Avello, & Suwalsky, 2006).

Este proceso de generación de radicales libres debe ser controlado por moléculas antioxidantes, que son capaces de neutralizar la acción oxidante del radical libre, si esto no sucede puede desarrollarse diversas patologías crónicas degenerativas, como enfermedades pulmonares, cardiovasculares, inmunológicas y neurodegenerativas (Galván et al, 2008). La reactividad y toxicidad de los radicales libres está también relacionada con el proceso de envejecimiento (Avello, & Suwalsky, 2006). En síntesis, los radicales libres producen daño sobre todo a cuatro sistemas celulares básicos: la respiración aeróbica, la síntesis de proteínas, la membrana celular y el ADN celular (Galván et al, 2008).

Los radicales derivados del oxígeno son los que representan la mayoría de radicales que se generan en los seres vivos, como ejemplo de ellos tenemos el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^+), radical perhidroxilo (HO_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical alcoxilo (RO^-), radical peroxilo (ROO^-).

Son importantes también las especies reactivas del nitrógeno, que causan el estrés nitrosativo, entre ellas destacan el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (NO_3^-) generado cuando reaccionan el óxido nítrico y el radical superóxido. (González & García, 2012).

Tabla 1. Clasificación de los radicales libres (González & García, 2012)

Clasificación	Radical libre	Abreviatura
Especies reactivas de oxígeno	Oxígeno	O ₂
	Ion Superóxido	O ₂ ⁻
	Radical hidroxilo	OH ⁻
	Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
	Radicales alcoxilo	RO ⁻
	Radical peroxilo	ROO ⁻
	Radical hidroperoxilo	ROOH ⁻
Especies reactivas de nitrógeno	Óxido nítrico	NO ⁻
	Dióxido nítrico	NO ₂ ⁻
	Peroxinitrilo	ONOO ⁻

1.2.1.1 Mecanismos de formación de los radicales libres

Los radicales libres se pueden formar por diversos mecanismos, el más común es la adición de un electrón a una molécula estable. En las que hay una transferencia de electrones que necesariamente implican la reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) de las moléculas participantes, que se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí (Corrales, Muñoz, 2012).

Estas reacciones bioquímicas se clasifican en tres grupos: reacciones de iniciación en la formación de un radical libre a partir de no radicales, reacciones de propagación en la que se forma un radical libre cuando reacciona una molécula estable con un radical libre y las reacciones de terminación cuando se produce una reacción química entre dos radicales libres y se genera un compuesto estable (Corrales & Ariza, 2012).

1.2.1.2 Fuentes endógenas de ROS

La mitocondria es considerada como la principal fuente de radicales libres y los más importantes son los compuestos de oxígeno (Coronado et al, 2015).



El anión **superóxido** (O_2^-), es el más importante a nivel celular y se produce en diferentes organelos celulares como en las mitocondrias, en el retículo endoplásmico y en el citosol (Corrales & Ariza, 2012).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es un radical libre, pero es una forma muy reactiva que genera hidroxilo en presencia de metales como el hierro. Se forma en la mitocondria, en el retículo endoplásmico (López, 2008).

Radical Hidroxilo (OH^\cdot) Posee una alta reactividad y una vida media muy corta, debido a que reacciona de manera rápida e inespecífica con los blancos celulares más cercanos (ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos) (Corrales & Ariza, 2012).

Oxígeno molecular (O_2) es básicamente oxidante, en condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (O_2) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (alrededor del 5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son literalmente radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo) (Avello, & Suwalsky, 2006).

1.2.1.3 Fuentes exógenas de radicales libres

Algunos ejemplos de sustancias que favorecen la formación de los radicales libres, son; la exposición a rayos X, al ozono, al tabaco, pesticidas, la contaminación ambiental y productos químicos industriales, además de ciertos medicamentos, y el deporte exhaustivo (Corrales & Ariza, 2012) (Avello, & Suwalsky, 2006).

Tabla 2. Fuentes exógenas que promueven el aumento de radicales libres. (Corrales & Ariza, 2012).

Contaminantes	Ozono Monóxido de carbono Toxinas
Radiaciones	Ultravioleta Rayos X Gamma



Dieta	Ácidos grasos poliinsaturados Ácidos grasos Glucosa
Otros	Tabaco Ejercicio intenso

1.2.1.4 Formación de ROS en el deporte

Los ROS en el deporte tienen efectos positivos sobre la contracción muscular y adaptación al ejercicio sistemático; sin embargo, factores externos asociados a la práctica deportiva, como las condiciones climáticas y una deficiente alimentación y suplementación, pueden desencadenar un desequilibrio entre los radicales libres y los mecanismos antioxidantes (Muñiz, 2014).

La actividad física vigorosa puede incrementar el consumo de oxígeno en 10 a 15 veces por encima del valor de reposo para satisfacer las demandas de energía. El elevado consumo de oxígeno resultante produce un estrés oxidativo que conduce a la generación de radicales libres y peroxidación de lípidos (Del Castillo, 2000).

Se ha visto que el daño oxidativo se reduce cuando se practica ejercicio regularmente y aumenta cuando se lo realiza en sesiones aisladas, mientras que el ejercicio excesivo y el sobre-entrenamiento conducen a un estado de estrés oxidativo (González & García, 2012).

En el metabolismo aeróbico en el ejercicio de baja y moderada intensidad, el metabolismo aeróbico forma ATP para suplir la necesidad de energía, al final de las reacciones se forma O_2^- . Si la actividad mitocondrial es incrementada y mantenida en el tiempo se forma OH^- o reaccionar con el NO para formar $ONOO^-$ (Fernández et al, 2009).

Durante el ejercicio intenso y de corta duración también se recurre al metabolismo anaeróbico, debido a la demanda de flujo sanguíneo en el músculo hay órganos que tienen períodos de hipoxia, al finalizar la contracción muscular, los órganos vuelven a recibir flujo sanguíneo de forma brusca, llegando gran



cantidad de oxígeno, este fenómeno se llama “isquemia-reperfusión” (De Pinho et al, 2010).

Hay estudios que indican que la hipertermia aumenta el estrés oxidativo y afecta selectivamente a marcadores lipídicos específicos, independientemente del consumo de oxígeno, se eleva la secreción adrenérgica y la producción de lactato como consecuencia de una mayor utilización de la vía glucolítica anaeróbica (Mc Anult, 2005).

El incremento de la autooxidación normal de hemoglobina (aproximadamente 3% o menos) conduce durante el ejercicio físico a la formación de metahemoglobina y de O_2^- . Tanto la isquemia-reperfusión como los fenómenos de hipoxia estarían directamente relacionados con la autooxidación de la mioglobina y la hemoglobina debido al incremento de NADH, a la producción de H_2O_2 y a la acidificación del medio celular (Fernández et al, 2009).

La Hipoxia podrían dañar las estructuras biológicas, esto se puede observar al practicar ejercicio en altitud (por sobre los 3000 msnm), se forman los radicales alcoxilo y peroxilo (Pomar et al, 2017).

1.2.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se altera la homeostasis intracelular, reflejada por el desequilibrio entre respuestas prooxidantes y antioxidantes (Galván et al, 2008).

Durante el metabolismo oxidativo de la célula, el oxígeno que se respira es conjugado con hidrógeno y electrones para formar agua en la cadena respiratoria de las mitocondrias de todos los tejidos. (Salinas, 2007). Es paradójico pensar que el oxígeno es fundamental para la existencia de la vida pero a la vez puede causar daño (González & García, 2012).

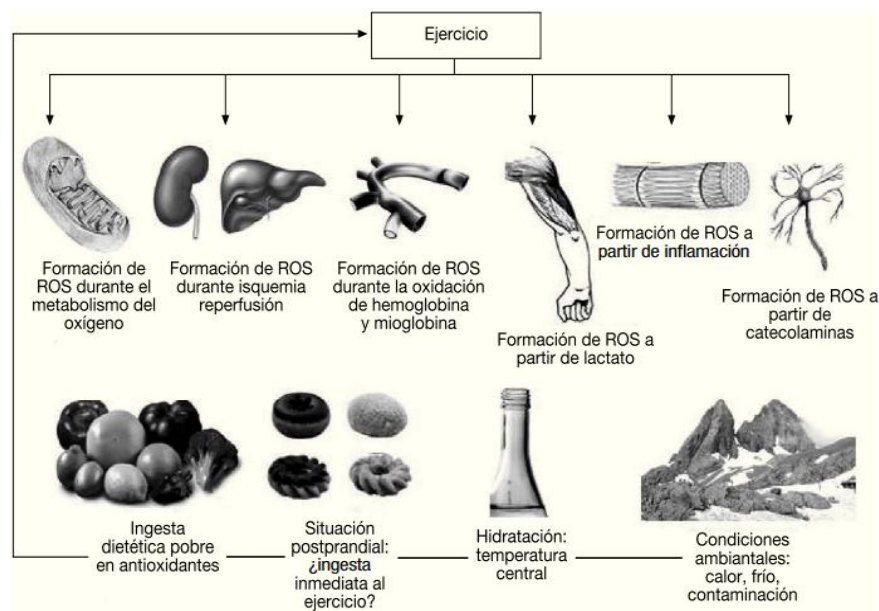


Figura 1. Factores de riesgo asociados al ejercicio (Fernández, et al, 2009).

1.2.2.1 Estrés oxidativo y el deporte

El daño oxidativo dependerá de la agresividad química del propio oxidante, de la cantidad de éste y del tiempo de exposición, así como del tipo de tejido que sufra el efecto y de la eficacia de las defensas antioxidantes disponibles. Sobre todo se produce en el ejercicio físico de carácter excéntrico. (Jackson, 2008).

Los deportistas que se someten regularmente a ejercicios físicos extenuantes, a lo largo de los años pueden acumular productos de daño molecular especialmente en músculo esquelético, hueso, cartílago, hígado e inflamación generalizada (González & García, 2012). Algunos estudios indican que al incluir alimentos con antioxidantes se reduce el estrés oxidativo, (Coronado et al, 2015), y al disminuir la acumulación de radicales libres, podría contribuir a mejorar la salud a largo plazo de los atletas (González & García, 2012)

El estrés oxidativo durante el ejercicio exhaustivo produce un daño a nivel de la membrana del miocito, lo que conduce a una exacerbada respuesta inflamatoria,



que se asocia a un aumento significativo de al menos, dos veces la generación de radicales libres en el músculo y otros tejidos (Fisher & Bloomer, 2009).

El músculo en las fases iniciales de un ejercicio genera ROS como un mecanismo fisiológico que le permite alcanzar un nivel de oxidantes que favorezca una contracción dinámica óptima. Sin embargo, en esta misma cinética, también es posible que si la duración o intensidad del ejercicio superan un umbral determinado se produzca una sobreproducción de ROS capaz de reducir la capacidad contráctil del músculo (Fernández et al, 2009).

Algunos estudios han demostrado que los ROS específicas se generan de manera controlada por las fibras musculares esqueléticas en respuesta a estímulos fisiológicos y juegan un papel importante en las adaptaciones del músculo a las contracciones. Estos beneficios positivos de los ROS que son inducidos por la actividad contráctil del músculo contrastan fuertemente con la creciente evidencia de que las vías degenerativas inducidas por ROS son fundamentales para el proceso de envejecimiento en el músculo esquelético (Jackson, 2008).

1.2.2.2 Estrés oxidativo y efectos sobre la salud

Los ROS debido a su alta reactividad pueden llegar a causar diferentes daños a nivel celular, tales como; oxidación de lípidos (lipoperoxidación), de grupos sulfidril de las proteínas, de bases púricas y pirimidínicas, generando alteraciones celulares que pueden ser el primer paso para el desarrollo de patologías. Diversos estudios han comprobado que los ROS están implicados en el envejecimiento y enfermedades como: Parkinson, artritis reumatoide, cirrosis, pancreatitis, hepatotoxicidad, isquemia, cáncer, aterosclerosis, asma, entre otras, en todas estas enfermedades las alteraciones celulares incluyen reclutamiento de macrófagos, daño mitocondrial, interferencia con defensas antioxidantes, aumento del calcio intracelular y conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa (Corrales & Ariza, 2012).

1.2.2.3 Daño a las proteínas

En el caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos que impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.) (Fanning et al., 2006).

1.2.2.4. Efectos sobre el ADN

Otra molécula que es dañada por los ROS es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo cual tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por daño al gen específico (Fanning et al., 2006).

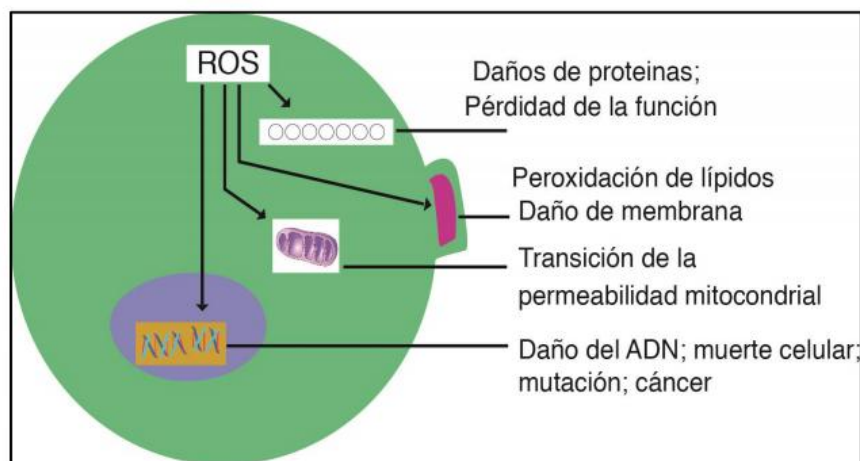


Figura 2. Daño de los ROS en la célula (Vasudevan, D., & Vaidyanathan, K., 2011)

1.2.2.5 Daño producido sobre los lípidos (peroxidación lipídica)

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular en su composición tiene proteínas, que cumplen importantes funciones como la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva. Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica, estos ácidos grasos, al romperse, forman gases hidrocarbonatos (tales como etano o pentano) y aldehídos (por ejemplo, malondialdehído). Varios trabajos investigativos confirman que el contenido de malondialdehído durante el ejercicio se incrementa en varios tejidos, y se comprobó que la magnitud de la peroxidación lipídica parece estar estrechamente vinculada con la intensidad del ejercicio practicado (Corrales & Ariza, 2012).

La peroxidación lipídica es generalmente inducida por un radical hidroxilo, el cual sustrae un hidrógeno de la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carboxilo, lo cual genera una cadena de reacciones oxidativas. Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular (Avello, & Suwalsky, 2006).

Tabla 3. Efectos patológicos del estrés oxidativo en los diferentes órganos (Galván, et al, 2008)

Órgano	Daño que causa
Cerebro/ Sist. Nervioso	Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple
Envejecimiento	Envejecimiento prematuro, cáncer
Corazón y Sist. vascular	Aterosclerosis
Inflamación y daño inmune	Glomerulonefritis artritis reumatoide, hepatitis
Ojo	Cataratas, degeneración macular
Piel	Quemaduras, porfiria, dermatitis de contacto
Riñón	Síndromes renales autoinmunes, nefrotoxicidad
Tracto gastrointestinal	Daño hepático, pancreatitis,
Tracto respiratorio	Enfisema, hiperoxia, asma, fibrosis quística



1.3 MECANISMO ANTIOXIDANTE

1.3.1 Sistemas de defensa biológica contra los RL

En respuesta a los radicales libres, los organismos evolutivamente han desarrollado una amplia variedad de mecanismos de defensas antioxidantes (Avello & Suwalsky, 2006), para neutralizar a las especies reactivas de cualquier elemento. Se define como antioxidante a “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser lípido, proteína, ADN o cualquier otro tipo de molécula (Corrales & Ariza, 2012).

El antioxidante al reaccionar con el ROS le cede un electrón oxidándose y transformándose en un ROS débil no tóxico. Los antioxidantes actúan de diferente manera, los enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los ROS (Galván et al 2008).

Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos. Los antioxidantes exógenos son los que ingresan a través de la cadena alimentaria, y endógenos que son sintetizados por la célula. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado ROS o hacia varios. La vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos. La vitamina E por lo tanto es considerada como el agente más importante protector de las moléculas lipídicas, neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales hidroxilos, neutraliza peróxidos y captura anión superóxido. La vitamina C: neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales hidroxilos, captura anión superóxido. El betacaroteno neutraliza el oxígeno singlete (Núñez, 2008).

En el ejercicio físico intenso se incrementa la concentración plasmática de ácido úrico, llegando a los músculos y protegiéndolos de la acción oxidativa de los radicales libres (González & García, 2012).

El alopurinol previene el daño muscular después del ejercicio exhaustivo, pero también modifica las vías de señalización celular asociadas con el ejercicio, que son útiles en las adaptaciones a los entrenamientos (Gómez, 2008).

Las defensas contra los radicales libres tienden a impedir su formación o los neutraliza una vez que se forman y se efectúa en 5 niveles:

- Primer nivel: consiste en evitar la reducción del oxígeno mediante sistemas enzimáticos, sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos, mediante la citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial.
- Segundo nivel: Aquí se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), metaloenzima que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.
- Tercer nivel: dado por un grupo de enzimas catalasa y la glutatión-peroxidasa que cataliza la reacción de oxidación del glutatión, y neutralizan el peróxido de hidrógeno.
- Cuarto nivel: En este nivel actúan las Vitaminas C y E.
- Quinto nivel: Se produce la reparación del daño molecular (Galván et al, 2008).

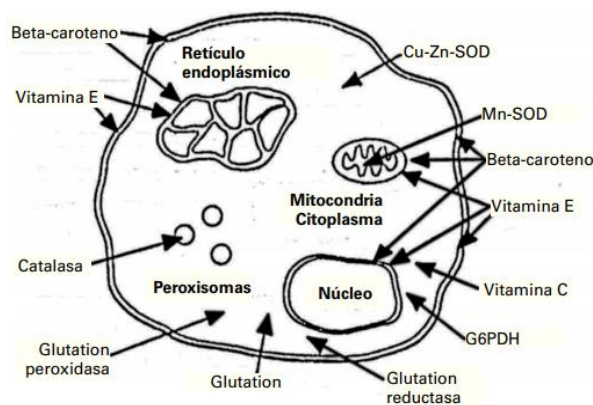


Figura 3. Lugar específico donde actúa cada antioxidante (Galván et al, 2008)

1.3.2 Alimentos que contienen antioxidantes



El consumo regular de varias frutas y verduras frescas, granos enteros, legumbres y frijoles, brotes y semillas es una forma efectiva y segura de cumplir con todos los requisitos de antioxidantes en personas físicamente activas y atletas (Yaravi et al, 2015).

Tabla 4. Alimentos que contienen antioxidantes (González, C., & García, L., 2012)

Sustancia	Fuentes
Ácido ascórbico	Vegetales verdes, granos, frutas cítricas, kiwi, espárragos, aguacate, remolacha, brócoli, melón, cebolla, mango, papaya, perejil, piña, espinaca, rábano, papa, berenjena apio, fresa, berro.
Tocoferoles	Espinaca, nueces, cacahuete, cereales, germen de trigo, aceites vegetales envasados en frío.
β-Caroteno	Aceite de hígado de pescado, alfalfa, zanahoria, acelga, papaya, durazno, pimiento rojo, jitomate, almendras.
Licopeno	Jitomate, sandía, guayaba.
Europeína	Uva, vino tinto.
Oleína	Aceite de oliva.
Flavonoides	Germinado de alfalfa, espinaca, limón, cebolla, chiles, nopal, manzana roja, uva roja, naranja, vio, cerveza, té verde té negro, arándano.
Piridoxamina (B ₆)	Carne, vísceras, pescado, leche, huevo, papa, camote, cáscara de arroz, aguacate, avellanas, almendras, levadura de cerveza.

1.4 MARCADORES BIOLÓGICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

Si el ejercicio aumenta la producción de radicales libres debe evidenciarse de alguna manera. Debido a la vida muy corta de los radicales libres es muy complejo medirlos directamente (Corrales & Ariza, 2012).

Por esto, se han desarrollado algunas técnicas que incluyen HPLC y técnicas espectrofotométricas para medir ya sea directa o indirectamente el daño que los radicales libres provocan en el organismo. Estas determinaciones pueden



llevarse a cabo en muestras de sangre total, en plasma, suero sanguíneo y/u orina (González & García, 2012).

1.4.1 Proteínas carboniladas

El contenido de proteínas carboniladas, generadas por una ruptura y oxidación de la cadena polipeptídica principal o por una oxidación de las cadenas laterales se puede cuantificar como marcador de estrés oxidativo (González & García, 2012).

1.4.2 ADN

El daño que ha sufrido el ADN se puede valorar midiendo la concentración de 8-hidroxiguanosina en orina, empleado varias técnicas, entre las que se incluyen HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia, de acuerdo con sus siglas en inglés), GCMS (cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas) así como ensayos enzimáticos (Urso y Clarkson, 2003).

1.4.3 Homocisteína

Cuantificación de la homocisteína, ya que existen evidencias de que sus niveles se incrementan en el ejercicio, y al mismo tiempo disminuye la concentración de óxido nítrico endotelial (González & García, 2012).

1.4.4 Glutación

El glutatión es un antioxidante que se emplea como medida de estrés oxidativo. Así, la ratio GHS oxidado/GHS reducido disminuye bajo condiciones oxidativas (Urso y Clarkson, 2003).

La determinación de nuestro interés es la medición de malondialdehído como marcador de estrés oxidativo impuesto por el ejercicio físico (Palacios et al, 2015).

1.4.5 Malondialdehído (MDA)

El MDA es un cetoaldehído fisiológico producido por descomposición de lípidos insaturados provenientes del metabolismo del ácido araquidónico. El exceso de MDA producido como resultado del daño tisular puede combinarse con grupos aminos de proteínas (este reacciona fundamentalmente con residuos de lisina por la reacción de adición de Michael) lo que produce aductos de proteínas modificadas, que pueden ser detectadas en el suero sanguíneo (Tsikas et al., 2005).

El contenido de malondialdehído durante el ejercicio se incrementa en varios tejidos y se comprobó que la magnitud de la peroxidación lipídica parece estar estrechamente vinculada con la intensidad del ejercicio practicado (González & García, 2012).

El malondialdehído (MDA) a pH bajo y temperatura elevada, participa fácilmente en la reacción de adición nucleófila con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), generando un aducto rojo, fluorescente 1: 2 MDA: TBA que se puede cuantificar por espectrofotometría de absorción visible este es el método analítico más utilizado (Janero, 1990).

En este estudio también cuantificaremos CPK y LDH como marcadores de lesión muscular.

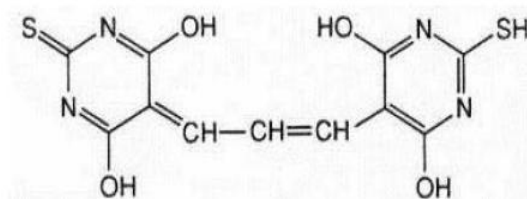


Figura 4. Aducto cromógeno MDA-TBA

1.4.6 Creatínfosfoquinasa (CPK)

La creatínfosfoquinasa (CK) es una enzima que se encuentra tanto en el citosol como en las mitocondrias de los tejidos donde la demanda de energía es alta.

En el citosol la CK está compuesta por dos subunidades: M (tipo muscular) y B (tipo cerebral). Estas subunidades permiten la formación de tres isoenzimas específicas de tejido: CK-MB (músculo cardíaco), CK-MM (músculo esquelético) y CK-BB (cerebro). Típicamente, la proporción de subunidades varía con el tipo de músculo: músculo esquelético: 98% MM y 2% MB y músculo cardíaco: 70–80% MM y 20–30% MB, mientras que el cerebro tiene predominantemente BB (Baird, et al, 2012).

La creatin-quinasa es una enzima que cataliza la fosforilación reversible de la creatina por el Adenosín Trifosfato (ATP). Cuando el músculo se contrae, el ATP se consume y la creatin quinasa cataliza la refosforilación del ADP para formar ATP, usando fosfocreatina como reservorio de la fosforilación. Cuando se entrena, se agreda, se daña, se rompe las microestructuras del sarcómero, que es el lugar donde se produce la contracción muscular (Sandoval, 2003).

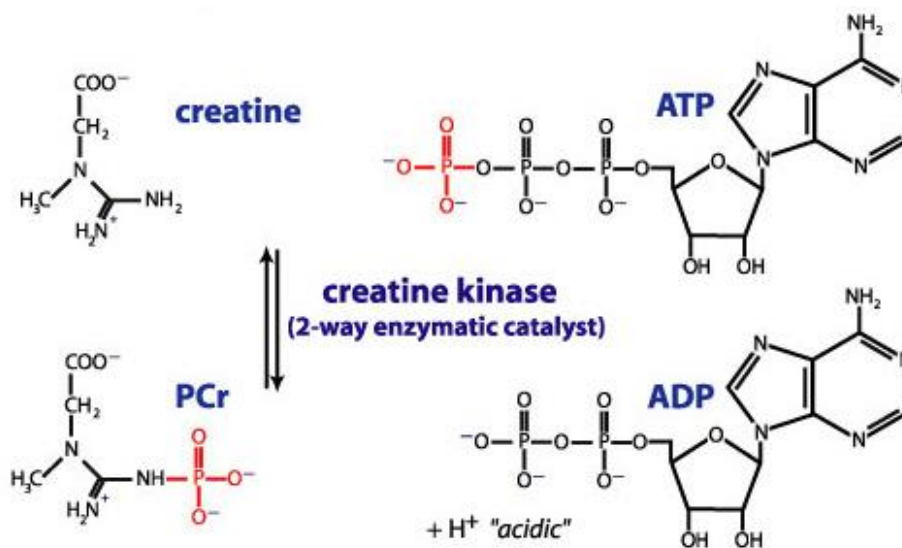


Figura 5. Reacción que cataliza la CPK (Palacios, 2015)

Las personas que participan regularmente en ejercicios intensos de gran volumen, tienden a tener niveles base de CK significativamente elevados en comparación con las personas sedentarias y de ejercicio moderado (Baird et al, 2012).



Tales niveles indican claramente una perturbación fuerte o desintegración del tejido muscular estriado con la fuga concomitante de los constituyentes musculares intracelulares en la circulación.

Por lo tanto, los altos niveles de CK en suero, en ausencia de daño muscular u otras condiciones patológicas, pueden reflejar el nivel de actividad enzimática tisular del individuo (Baird et al, 2012)

Este parámetro se mide para valorar los entrenamientos, su elevación es proporcional a la intensidad y duración del ejercicio, pero existe una adaptación en el entrenamiento, que facilita que en personas entrenadas se eleve menos que en sedentarias. Valores elevados respecto al basal, indican trauma o sobreentrenamiento y su concentración puede ser utilizada para monitorizar el regreso a la actividad normal de atletas que hayan sufrido una lesión muscular anterior (Palacios, et al, 2015).

Los niveles de CK total dependen de la edad, género, la raza, la masa muscular, la actividad física y las condiciones climáticas. Los altos niveles de CK en suero en sujetos aparentemente sanos se relacionan con el entrenamiento físico y daño en la estructura muscular. Si se corre un sprint de 100 metros en llano, el cuerpo captará la energía directamente del músculo, precisamente de la fosfocreatina (Urdampilleta et al, 2013).

Se estudió el comportamiento de la CK total en una triatleta de modalidad olímpica, al finalizar la competencia la concentración de CK fue de 151 U/L, aumentó con respecto a las concentraciones basales que fueron de 66.7 U/L y continuó incrementándose hasta las 72 horas, llegando a su nivel máximo de 296 U/L, de los valores medidos de la CK se puede deducir que el atleta posee una adaptación al entrenamiento, debido a que presenta valores considerablemente altos comparados a los establecidos como normales en la población normal (Pérez, 2014).

1.4.7 Deshidrogenasa Láctica

La enzima lactato deshidrogenasa, está presente en muchos tejidos del cuerpo, pero es mayor su presencia en el corazón, hígado, riñones, músculos esqueléticos, glóbulos rojos, en el cerebro y en los pulmones (Urdampilleta et al, 2013).

La LDH cataliza la interconversión de piruvato y lactato, que son metabolitos de combustible críticos del músculo esquelético, particularmente durante el ejercicio (Liang, et al, 2016). En deportes más anaerobios se la puede encontrar elevada. Aproximadamente el 20% del lactato producido durante el ejercicio se oxida a piruvato (Urdampilleta et al, 2013). Cuando existe daño muscular o lo que es lo mismo, destrucción de fibras musculares, los niveles de LDH en suero aumentan considerablemente, se la utiliza para evaluar la presencia de lesiones en los tejidos (Palacios et al, 2015).

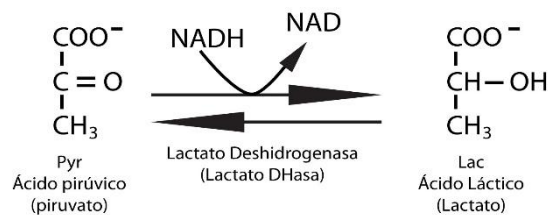


Figura 6. Oxidación reversible de lactato a piruvato (Palacios, 2015)

Normalmente, hay cinco isoenzimas de la deshidrogenasa láctica presentes en células vivas y conformadas por la combinación entre polipéptidos-M y polipéptidos H (Aranda, 2010).

Los complejos de isoenzimas LDH se clasifican en LDH1 (B4), LDH2 (A1B3), LDH3 (A2B2), LDH4 (A3B1) y LDH5 (A4) basado en diferentes combinaciones de LDH-A y las Isoformas LDH-B. La isoforma LDH-A es también conocida como la isoforma M, expresada predominantemente en el músculo esquelético, mientras que LDH-B también se refiere a la isoforma H, se expresa principalmente en el músculo cardíaco. Los estudios han demostrado que la isoenzima LDH-A favorece la reacción que convierte piruvato a lactato, mientras



que el isoenzima LDH-B prefiere la reacción inversa que produce piruvato a partir de lactato (Liang, et al, 2016).

La LDH se eleva significativamente en el caso de rhabdomiolisis, como se observó en el estudio realizado a una persona luego de una sesión de spinning, llegando a valores de 2820 U/L (Torres et al, 2016).

Una disminución de esta enzima a una misma intensidad de carga de entrenamiento supone una adaptación con menor grado de conversión hacia el metabolismo anaeróbico, es decir, mayor eficiencia metabólica (Clemente, 2011).

Así, la LDH total presenta incrementos después de entrenamientos de corta duración y alta intensidad, aunque también se eleva en deportes de resistencia de larga duración (Urdampilleta et al, 2013).

Durante el ejercicio las células transforman la glucosa en lactato, que es liberado a la sangre, que puede ser recogido por el hígado que lo vuelve a transformar en glucosa que va a la sangre para que pueda volver a utilizarse (Palacios et al, 2015)

En los deportes de equipo se observaron las diferencias significativas antes y después de los partidos (con unos valores de 781 mU/ml frente a 1.248 U/ml), y recuperándose a las 48 horas los valores basales (Rodenburg, De Boer, 1993).

El valor promedio normal en adultos es de 50 - 150 U/L (Aranda, 2010).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de estudio

Es una investigación de campo, descriptiva, cuasi-experimental, comparativa y transversal. El proyecto se desarrolla en la pista de atletismo “Jefferson Pérez” que es el sitio en el que entrenan los atletas de alto nivel, en el parque “De la madre” en el que entrenan los atletas del grupo control, en laboratorios del INSPI-Dr. Leopoldo Izquieta Pérez CZ6 y en el laboratorio Accu-lab.

2.2 Muestra

Se trata de un estudio piloto, que se llevó a cabo con 30 deportistas ($n=30$), que aceptaron participar en la investigación. Para considerar el tamaño de la muestra se tomó en cuenta que no existen gran cantidad de atletas que cumplan con las condiciones de pertenecer al grupo de alto nivel. Se trabajó con 10 atletas de alto nivel ($n=10$), que en su mayoría pertenecen a la selección de atletismo del Ecuador y los 20 restantes son atletas del grupo control $n=20$.

2.3 Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyó a deportistas de alto nivel, que entrenan un mínimo de 3 horas diarias, de cualquier sexo, de etnia indistinta, que aceptaron voluntariamente participar en el estudio. Para el grupo problema se escogió atletas que entrenan de tres a cinco veces por semana de 1 a 2 horas. Se excluyó atletas menores de edad y mayores de 45 años y se les informó sobre los objetivos y alcances de la investigación y se les solicitó por escrito la firma del consentimiento para participar en el estudio (Anexo 1).



2.4 Técnica de recolección de datos

Para la recolección de datos se realizó un cuestionario diseñado por el investigador (anexo 2), en el que se incluyó datos como edad, género, etnia, horas que la práctica deportiva, hidratación, medicamentos que toman.

2.5 Método de análisis de las variables

De la presente investigación se puede obtener dos categorías de ensayos de las cuales se desprenden las variables, en la primera están las enzimas de daño muscular que son la CPK y la LDH y la segunda es el ensayo toxicológico en la que se determina MDA como indicador de estrés oxidativo.

Tabla 5. Descripción de la metodología usada para la determinación de las variables analizadas en la presente investigación

CATEGORIA	VARIABLE	DESCRIPCION DEL METODO DE ANALISIS
Enzimas de daño muscular	CPK	Prueba cinética colorimétrica acoplada a espectrofotometría
	LDH	Prueba cinética colorimétrica acoplada a espectrofotometría
Ensayo toxicológico	MDA	Reacción colorimétrica determinada por espectrofotómetro

2.6 Materiales

Los materiales que se usaron en este estudio fueron, tubos al vacío sin anticoagulantes, agujas de toma #20G, algodón, alcohol, torniquete, gradillas, pipetas automáticas (Anexo 5).

2.7 Equipos

Los equipos que se requieren son:



Centrífuga Thermo Scientific y microcentrífuga Thermo Scientific E-FLU-0.23, de procedencia americana.

Baño María Gemmy Industrial Corp YCW-0-10 de procedencia Taiwán.

Balanza analítica DU Mettler Toledo XA 105 de procedencia española.

pH-metro, vortex.

Cabina de bioseguridad Labconco, USA.

Congelador -80 °C, Thermo Schientific, USA.

Lector de placas Bio Tek E-EG-001, Germany

Espectrofotómetro Stat fax 1904 Plus, USA (Anexo 4,7)

2.8 Reactivos

- CK NAC liquiUV HUMAN
- LDH SCE mod. liquiUV HUMAN
- OxiSelect TBARS Assay kit (MDA), que se fundamenta a través de los métodos de Ohkawa y Asakawa modificados, basados en la reacción del MDA con el ácido 2- tiobarbitúrico (TBA) observándose una aducto MDA–TBA cromógeno, medido a través de espectrofotometría en suero sanguíneo.

2.9 Procedimiento

2.9.1 Preanálisis

- Luego de que los deportistas firmaron el consentimiento informado y llenaron la encuesta (Anexo 1 y 2), se realizó la extracción de sangre mediante venopunción a los participantes del estudio que cumplieron con los parámetros de inclusión.



- La muestra se tomó en tubos al vacío de 10 ml que no contenían anticoagulantes, los tubos se transportaron al laboratorio para centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos, y obtener la fracción del suero.
- El suero se alicuotó en cuatro tubos, los dos primeros sin ningún conservante servirán el uno para posteriormente realizar la cuantificación de las enzimas (CPK total y LDH total) y el otro se guardó como respaldo de las muestras, ambos se conservaron en congelación a -20°C .
- A los dos tubos restantes se adicionó el reactivo butil hidroxitolueno (BHT), que viene en el kit de reactivo, (100 μL de suero con 1 μL de BHT) para prevenir una posterior oxidación y se llevó a ultracongelación de -80°C , de igual forma el uno se usó para el determinación del MDA y el otro se guardó como respaldo de las muestras.

2.9.2 Análisis de laboratorio

2.9.2.1 Determinación de creatinfosfoquinasa (CPK)

2.9.2.1.1 Fundamento del método

La creatinfosfoquinasa (CPK) cataliza la reacción entre la fosfocreatina (CP) y la 5'-difosfato de adenosina (ADP) con formación de creatina y 5'-trifosfato de adenosina (ATP), convirtiendo esta última la glucosa en glucosa-6-fosfato (G6P) en presencia de hexoquinasa (HK). La G6P es oxidada a Gluconato-6P en presencia de fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADP) reducido en una reacción catalizada por la deshidrogenasa glucosa-6-fosfato (G6PDH). La conversión se controla cinéticamente a 340 nm a través del aumento de la absorbancia resultante de la reducción del NADP^+ a $\text{NADPH} + \text{H}^+$, proporcional a la actividad de la CK presente en la muestra. En este método la inclusión de N-acetilcisteína (NAC) permite la activación óptima de la enzima (ANEXO 9).

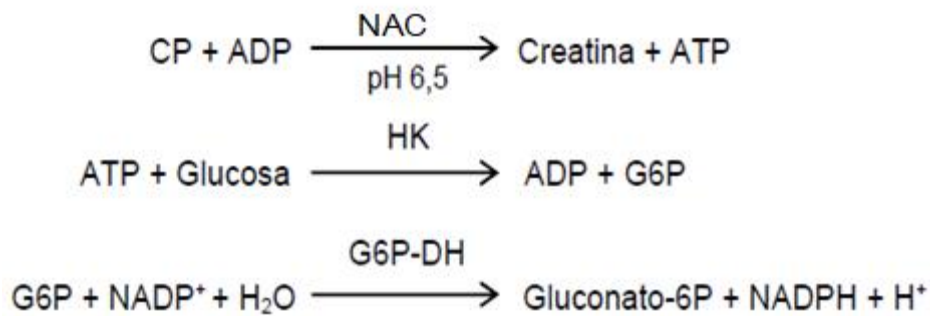


Figura 7. Reacciones de reducción del NADP a NADPH

2.9.2.1.2 Preparación de los reactivos

Mezclar 4 mL de **R1** + 1 mL de **R2**. Estable durante 1 mes a 2-8 °C ó 10 días a 16-25 °C. Resguardar de la luz.

2.9.2.1.3 Técnica

Preincubar el reactivo de trabajo, muestras y controles a la temperatura de reacción 37 °C. Ajustar a 0 el fotómetro con agua destilada. Pipetear en una cubeta: 1ml de Reactivo de trabajo y 20 µl de suero. Mezclar suavemente por inversión. Insertar la cubeta en el compartimiento del termostato del instrumento y poner el cronómetro en marcha. Incubar durante 3 minutos, y anotar la absorbancia inicial. Repetir las lecturas exactamente a los 1, 2 y 3 minutos. Calcular la diferencia entre absorbancias. Calcular el promedio de los resultados para obtener el cambio promedio en absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).



2.9.2.1.4 Cálculos

Se calcula la media de los cambios en la absorbancia por minuto y se multiplica por el factor a 37 °C

$$\Delta A / \text{min} \times 8095 = \text{U/L CPK (37 °C)}$$

2.9.2.1.5 Valores Normales

Hombres < 24-190 U/L

Mujeres < 24-170 U/L (HUMAN)

Control Humatrol 163.9 U/L Rango 117-175 U/L

2.9.2.2 Determinación de la Deshidrogenasa láctica

2.9.2.2.1 Fundamento del método

La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción de piruvato a lactato (P-L) en presencia de dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (NADH) a pH 7,5.

La reacción se controla cinéticamente a 340 nm a través de la disminución de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a NAD⁺ proporcional a la actividad LDH en la muestra.

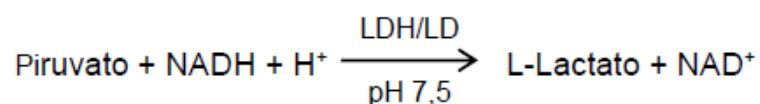


Figura 8. Reacción de oxidación del NADH a NAD



2.9.2.2.2 Preparación de los reactivos

Mezclar 4 mL de **R1** + 1 mL de **R2**. Estable 2 meses a 2-8 °C ó 2 días a 16-25 °C. Resguardar de la luz.

2.9.2.2.3 Técnica

Preincubar el reactivo de trabajo, muestra y patrón a la temperatura de reacción 37 ° C. Ajustar a 0 el fotómetro con agua destilada. Pipetear en una cubeta 1ml de Reactivo de trabajo y 20 µl de suero. Mezclar suavemente por inversión. Insertar la cubeta en el compartimiento temperado de lectura del instrumento y poner el cronómetro en marcha. Incubar durante 30 segundos, y anotar la absorbancia inicial. Repetir las lecturas exactamente a los 1, 2 y 3 minutos.

2.9.2.2.4 Cálculos

Se calcula el promedio de las lecturas de absorbancias por minuto ($\Delta A/\text{min}$) y se multiplica por el factor.

$$U/L = \Delta A/\text{min} \times 16030$$

2.9.2.2.5 Valores Normales: 207-401 U/L (HUMAN) (Anexo 10).

Control Humatrol 464.69 U/L Rango 357-513 U/L

2.9.2.3 Determinación de Malondialdehído

2.9.2.3.1 Fundamento del método

El kit de ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es una herramienta para la medición cuantitativa directa de MDA en muestras biológicas. Se basa en la formación del aducto coloreado malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA). Las muestras que contienen MDA desconocidas o los estándares de MDA reaccionan con TBA a 95 °C., luego de una breve incubación, las muestras y estándares pueden leerse espectrofotométricamente o fluorométricamente. El contenido de MDA en muestras desconocidas se



determina por comparación con la curva estándar de MDA predeterminada (Anexo 8).

2.9.2.3.2 Preparación de reactivos

- Solución de lisis SDS: si hay cristales o precipitados, calentar brevemente la solución a 37 ° C para redissolver los cristales de SDS.
- Reactivo TBA: prepare el reactivo TBA justo antes del uso. Preparar una solución de 5,2 mg / ml de reactivo TBA, pesando una cantidad de TBA necesaria para todas las muestras y estándares (por ejemplo: 130 mg de TBA es suficiente para preparar 100 pruebas). Añadir el diluyente ácido y agitar o mezclar vigorosamente hasta que el polvo se haya disuelto. Ajuste el pH de la solución a pH 3.5 con la solución de hidróxido de sodio (Anexo 8)

Nota: El Reactivo TBA es estable por 24 horas. No almacene ni reutilice soluciones diluidas.

2.9.2.3.3 Curva de calibración

Se realizó siguiendo las instrucciones el inserto del reactivo OxiSelect TBARS Assay kit, que se puede ver en resultados.

2.9.2.3.4 Técnica

1. Preparar y mezclar todos los reactivos por completo antes de usar. Cada muestra y estándar que contiene MDA debe analizarse por duplicado. Las muestras de MDA de alto contenido se pueden diluir aún más para el análisis.
2. Agregar 100 µL de muestras desconocidas o estándares MDA en los tubos de microcentrífuga.
3. Agregar 100 µL de la solución de lisis SDS tanto a las muestras desconocidas como a los estándares MDA. Mezcle bien. Incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 250 µL de reactivo TBA a cada muestra y estándar a ser probado.
5. Cerrar cada tubo e incubar a 95 ° C durante 45-60 minutos.



6. Retirar los tubos y enfriar a temperatura ambiente en un baño de hielo durante 5 minutos.
7. Centrifugar todos los tubos de muestra a 3000 rpm durante 15 minutos. Eliminar el sobrenadante de las muestras para un análisis posterior.
8. Transferir 300 μL del sobrenadante a otro tubo, agregue 300 μL de n-Butanol.
9. Agitar en un vórtex vigorosamente durante 1-2 minutos y centrifugue durante 5 minutos a 10.000 rpm.
10. Medida espectrofotométrica: Transferir 200 μL de los estándares y muestras de MDA a una microplaca de 96 pocillos compatible con un lector de placas espectrofotométrico. Dejar vacío un pocillo como control blanco 0 μM . Leer la absorbancia a 540 nm en lector de microplacas.

2.9.2.3.5 Cálculos

La concentración del MDA de las muestras problema, se obtendrá de acuerdo a la curva de calibración con los estándares de concentración conocida, que se la puede manejar como una ecuación de la recta estándar, linealizando la curva absorbancia- concentración mediante el logaritmo de las concentraciones en el eje X; el procedimiento consiste primero en encontrar la pendiente del gráfico, con este valor y la concentración hallada en la gráfica se encuentra el valor del termino independiente que puede ser extrapolado a cualquier valor de MDA que se desee conocer. (ANEXO 3)

2.10 Análisis estadístico

Las variables categóricas fueron presentadas como frecuencias y porcentajes y las cuantitativas a través de pruebas de estadística descriptiva y análisis de correlación de Pearson, para comparar los valores de MDA, (ANEXO 12) CPK y LDH (ANEXO 13) entre sí, también se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov, se comparó los niveles de las variables MDA, CPK y LDH del grupo de alto nivel con los del grupo control por medio de la U de Mann Whitney. Se



CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Análisis descriptivo de la muestra

Fue una investigación piloto, de campo basada en toma de muestras en el segmento de deportistas en Cuenca, entre la edad 18-48 años. La muestra del estudio está compuesta de 30 personas dividida en dos grupos 10 de alto nivel y 20 de grupo control. La edad promedio de los deportistas de alto nivel es de 26.3 años y los del grupo control de 30 años, en cuanto al género se tuvo que en el grupo de alto nivel un 60% son hombres y un 40 % mujeres y los deportistas control un 70% de hombres y 30% de mujeres. En cuanto a las horas de entrenamiento se tuvo que la mayoría del grupo control entrena 2 horas y el grupo de alto nivel 4 horas. En cuanto al índice de masa corporal (IMC) por tratarse de deportistas la mayoría (90%) está por debajo de 24.9 que, según la OMS, está dentro de lo normal. (ANEXO 6)

Tabla 6. Caracterización de la muestra

	DEPORTISTAS DE ALTO NIVEL		DEPORTISTAS CONTROL	
HOMBRES	60%		70%	
MUJERES	40%		30%	
EDAD (años)	26,3	±5,9	30,4	±9,5
TALLA (cm)	165,2	±9,7	168,25	±7,3
IMC	21,52	±1,7	22,065	±2,4
PESO (Kg)	59,07	±8,3	62,69	±9,0

3.2 Curva de calibración del MDA

La curva de calibración se realizó siguiendo indicaciones del inserto del reactivo, el patrón más alto tuvo una concentración de 125 μM , y el más bajo 0.98 μM , se usó también un tubo con agua destilada. El gráfico se realizó en el programa

Excel de acuerdo a las lecturas obtenidas y las concentraciones conocidas. (ANEXO 3).

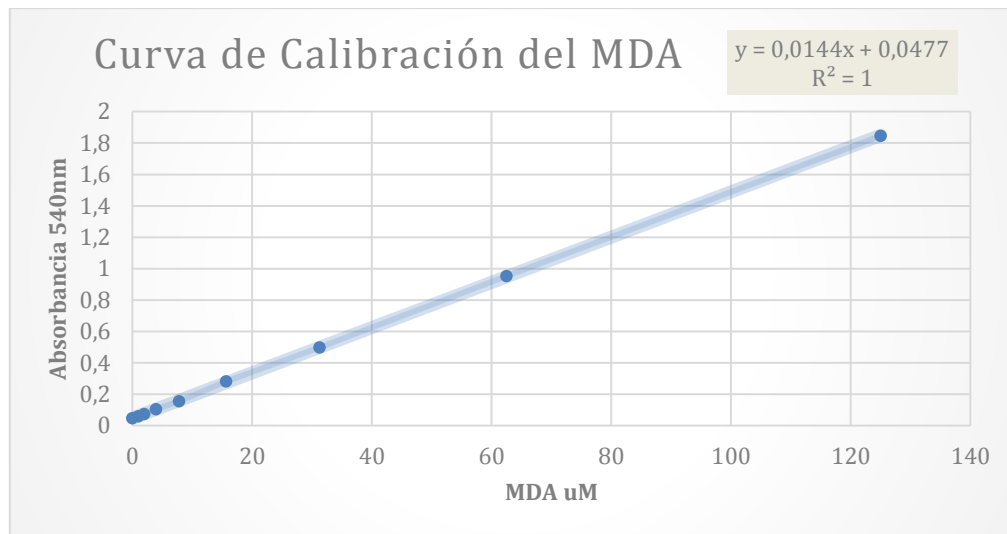


Figura 9. Curva de Calibración del MDA

3.3 Resultados obtenidos

En cuanto a las enzimas CPK y LDH, la prueba es cinética, y nos da la lectura de la concentración directamente en equipo semiautomático.

El MDA se obtuvo por cálculo de acuerdo a la fórmula $y=0,0144x+0,0477$ aplicada en la curva de calibración realizada con patrón de concentración conocida.

Tabla 7. Resultados grupo Alto nivel

CODIGO	MDA uM	CPK U/L	LDH U/L
1	5,09	286,0	367,9
2	7,45	345,0	390,3
3	6,756	380,4	468,5
4	6,895	272,4	489,1
5	5,437	182,6	334,4
6	7,5902	665,3	569,8
7	11,34	330,4	548,2
8	7,381	688,1	526,5
9	6,965	682,2	501,3
10	6,131	296,7	330,5

Tabla 8. Resultados grupo control

CODIGO	MDA μ M	CPK U/L	LDH U/L
11	2,381	104,1	310,1
12	3,006	83,2	324,5
13	1,895	96,2	273,3
14	4,395	181,1	473,7
15	3,77	252,1	241,8
16	3,701	333,8	377,1
17	3,354	276,7	309,4
18	2,868	222,6	364,6
19	4,881	221,9	358,7
20	4,951	337,4	335,1
21	2,034	163,2	467,8
22	2,52	113,1	241,8
23	1,27	240,9	375,8
24	1,895	176,8	344,9
25	0,923	83,6	322,6
26	1,479	260,8	286,4
27	1,82	105,8	434,9
28	5,645	363,6	387,0
29	5,02	293,6	457,3
30	4,881	271,0	328,5

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Correlación de Pearson

		MDA	CPK	LDH
alto nivel y control		concentración	concentración	concentración
alto nivel	MDA concentración	1	,198 ,583	,672* ,033
		10	10	10
	CPK concentración	,198 ,583	1	,689* ,027
		10	10	10
	LDH concentración	,672* ,033	,689* ,027	1
		10	10	10

Figura 10. Correlación de Pearson en el grupo de alto nivel



alto nivel y control		MDA concentración	CPK concentración	LDH concentración
grupo control	MDA concentración	1	,657**	,219
		,002	,002	,354
		20	20	20
grupo control	CPK concentración	,657**	1	,150
		,002		,528
		20	20	20
grupo control	LDH concentración	,219	,150	1
		,354	,528	
		20	20	20

Figura 11. Correlación de Pearson en el grupo control

Mediante la correlación de Pearson comparamos los valores de MDA, CPK y LDH, de los atletas de alto nivel con los del grupo control. Si los valores de coeficiente de Pearson cercanos a 1 muestran una alta correlación, entonces tenemos que de 0 - 0.199 hay una baja correlación y de 0.200 - 0.500 muestran una correlación mediana: los valores > 0.500 muestran una alta correlación. La correlación entre el MDA y CPK es baja en el grupo de alto nivel y alta en el grupo control. En cuanto al MDA con la LDH es alta en los deportistas de alto nivel y media en el grupo control. La CPK y LDH tiene una alta correlación en el alto nivel y baja correlación en el grupo control.

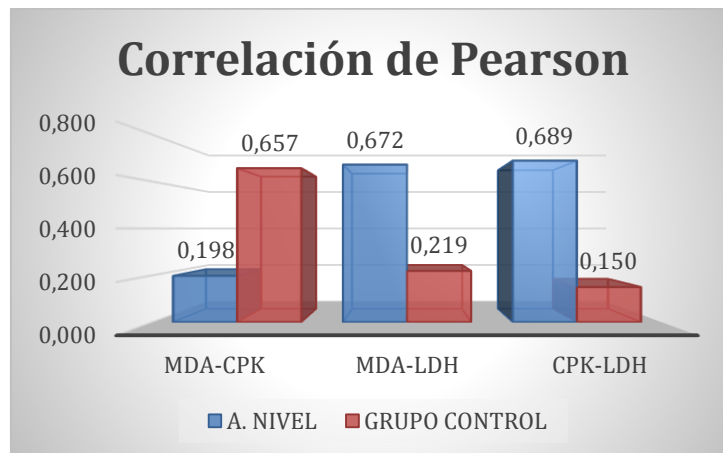


Figura 12. Correlación de Pearson

3.4.2 Comparación entre los dos grupos

3.4.2.1 Comparación de las medianas del MDA

En el caso del MDA, al analizar mediante Kolmogorov-Smirnov se rechaza la prueba de normalidad por lo que se recomienda las comparaciones entre grupos realizarlas entre las medianas.

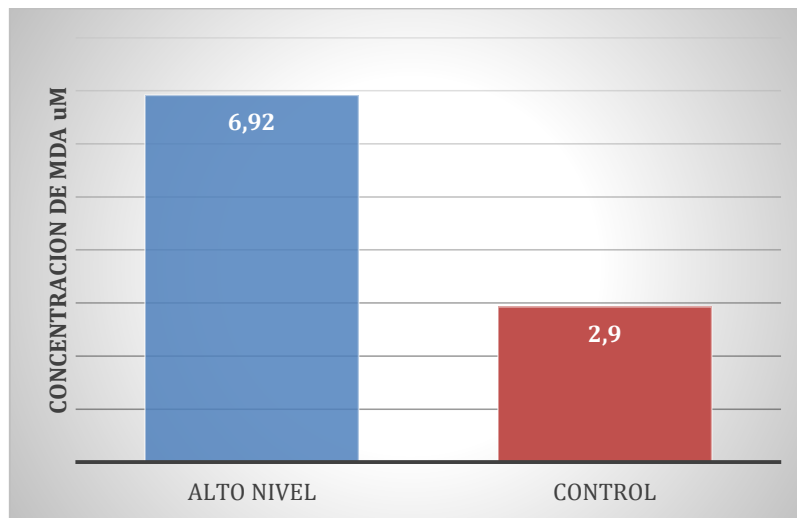


Figura 5. Comparación de las medianas de la MDA entre los dos grupos

Como se ve en el gráfico la concentración del MDA en el grupo de alto nivel es más alta y la concentración de la mediana fue de 6.92 (5.09-11.34) µM, la concentración de la mediana del grupo control fue de 2.93 (0.92-5.65) µM.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de MDA concentración es la misma entre las categorías de alto nivel y control.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,000 ¹	Rechaza la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Figura 14. Contraste de Hipótesis del MDA

Según el análisis de la U de Mann-Whitney se rechaza la hipótesis de homogeneidad de los grupos $p=0.001$. Por lo tanto, hay diferencia significativa entre los valores encontrados en el grupo de alto nivel y el grupo control.

3.4.2.2 Comparación de las medianas del CPK de los dos grupos

Los valores de las medianas del CPK encontramos más elevados en el grupo de alto nivel, con un valor de 337.7 U/L y 222.25 U/L en el grupo control.

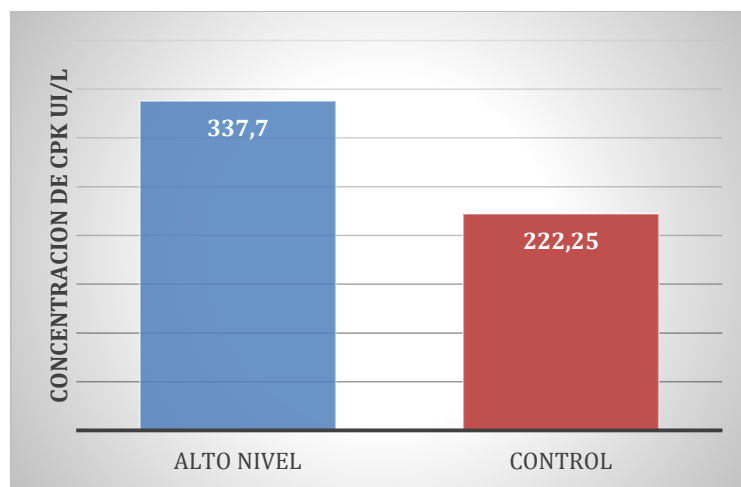


Figura 6. Comparación de las medias de la CPK entre los dos grupos

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de CPK concentración es la misma entre las categorías de alto nivel y control.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,001 ¹	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Figura 7. Contraste de Hipótesis del CPK

En este caso según la prueba de U de Mann Whitney se rechaza la hipótesis lo que quiere decir que hay diferencias significativas entre los dos grupos de análisis. $P = 0.001$.

3.4.2.3 Comparación de las medianas del LDH de los dos grupos

Al comparar las medianas obtenidas con la LDH se encontró más elevada en el grupo de alto 478.8 U/L, y en el grupo control 340.0 U/L.

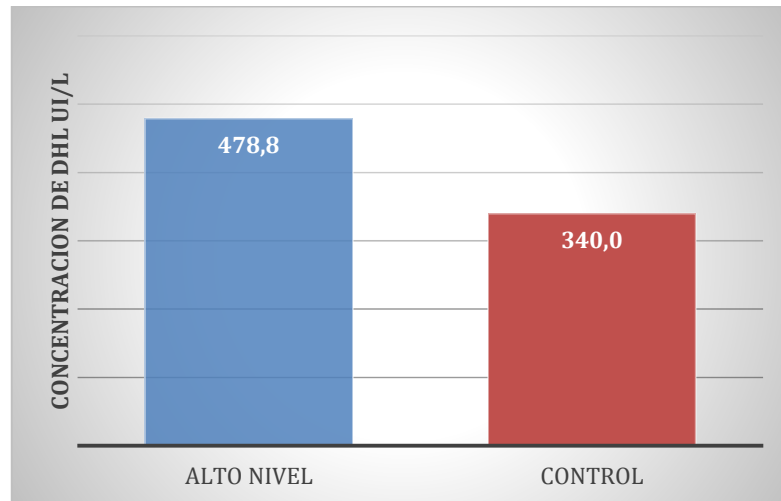


Figura 8. Comparación de las medias de la LDH entre los dos grupos

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de LDH concentración es la misma entre las categorías de alto nivel y control.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,003 ¹	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

¹ Se muestra la significación exacta para esta prueba.

Figura 9. Contraste de Hipótesis del LDH

En este caso de la LDH, según la prueba de U de Mann Whitney también se rechaza la hipótesis lo que quiere decir es que hay diferencias significativas entre los dos grupo. $P = 0.003$.



DISCUSIÓN

McAnulty et al, (2005) realizaron un estudio comparativo entre dos grupos de deportistas, uno de los cuales entrenaba en condiciones de calor y el otro a temperatura moderada, encontrando una relación entre la temperatura alta y la concentración de isoprostanos como biomarcadores de estrés oxidativo.

Los atletas de esta ciudad entrenan los fines de semana en la zona del Cajas, para mejorar su rendimiento, lo que podría aumentar el estrés oxidativo. Según el estudio realizado por Pomar et al, 2017, en el que compararon los valores promedio de MDA en el nivel del mar, con los valores promedio encontrados en La Paz, y observaron que en la altura son mayores, lo que apoya la teoría de que la hipoxia genera y aumenta RL (Pomar et al, 2017).

Al comparar las concentraciones de MDA usando el mismo método colorimétrico, se observa que existe variabilidad en el grupo control según diversos estudios reportados en la literatura, lo que podría deberse a factores como la diferente función de los sistemas antioxidantes de cada individuo, la edad, el tipo de alimentación, los grupos étnicos, los hábitos alimenticios y hasta la altura a la que viven. Estepa et al (2001), establecen un valor máximo de $2,35 \pm 1,35 \mu\text{M}$ en individuos de una edad promedio de 34 años ± 13 años. Pomar et al (2017), un promedio de $4,2 \mu\text{M}$ en personas que viven a una altura de 4200 m. En otro estudio en el que se comparó el MDA en personas sanas con personas obesas, se obtuvo un valor de MDA de 0.1 ± 0.06 para las personas sanas (Tursi et al, 2013). Y finalmente en un estudio donde compararon personas sanas con pacientes con enfermedades cardiovasculares se encontró un valor de 1.87 ± 0.27 en las personas sanas (Delgado et al, 2009).

Una de los retos del control biológico en los atletas es la estandarización de nuevos métodos diagnósticos que provean información sobre el estado fisiológico de los atletas para poder diseñar con eficiencia las cargas de trabajo por parte de los entrenadores (Pérez et al, 2014).

En este estudio se encontró que hay una diferencia significativa entre los atletas del grupo control y los de alto nivel en la CPK, LDH y MDA. Por lo que se diría



que al aumentar la intensidad del ejercicio también aumenta el estrés oxidativo de los atletas.

El ejercicio de alta intensidad se sabe que induce estrés oxidativo, pero no hay suficientes investigaciones para comprenderlo con claridad, ni se sabe si podrían traer consecuencias negativas a largo plazo (Luciano, 2013), por lo que se pensó que se debería seguir investigando más a profundidad el tema de los radicales libres en deportistas, los atletas de alto nivel con los que se trabajó, son en su mayoría de la selección del Ecuador, que llevan entrenando varios años.

Luego de leer varios estudios se puede cuestionar si los deportistas de alto nivel deberían consumir antioxidantes, en que dosis y si puede afectar a las funciones que cumplen los RL de adaptación a los entrenamientos (González, García, 2012), sobre todo cuando los entrenamientos se realizan en la zona del Cajas. Cuenca es una ciudad que se encuentra a la altura sobre el nivel de 2500 m. Además muchos de los deportistas realizan sus entrenamientos en el Cajas a 4000 m. de altura que se encuentra a una altura de aumentando hipoxia. En un estudio realizado en jugadores de balonmano se comparó durante 7 días a dos grupos, uno de los cuales consumía alimentos ricos en antioxidantes y se notó una disminución del estrés oxidativo (Estrada et al, 2017)

En un estudio realizado en los atletas del grupo de alto rendimiento de béisbol se muestra una diferencia significativa en cuanto a la concentración sérica de Creatinfosfoquinasa respecto al grupo control, el malondialdehído no muestra una elevación significativa (Laranza et al, 2016), en este estudio se encontró también que la CPK tuvo una elevación significativa en comparación con el grupo control, al igual que la LDH y el MDA. Cabe recalcar que la determinación del MDA la realizaron por otro método de análisis.

En otro estudio donde compararon atletas universitarios que practican deporte de alto nivel, la mitad de ellos realiza velocidad (atletas aeróbicos) y el otro grupo resistencia (atletas anaeróbicos). Se midió el estrés oxidativo y antioxidantes, en los deportistas, los resultados mostraron que el incremento del EO en los atletas aeróbicos es mayor que el de los anaeróbicos y el tiempo de recuperación



es mayor en los atletas anaeróbicos, según esto toda actividad de resistencia se asocia al estrés oxidativo y si es más intensa, mayor será el EO (Rangel et al, 2013). Los atletas de este estudio todos hacen ejercicios de resistencia.

CONCLUSIONES

Se encontró en este estudio, que los niveles de MDA en los deportistas de alto nivel tienen una concentración de 6.92 (5.09-11.31) μM y en los deportistas del grupo control 2.93 (0.92-5.65), estos dos valores tienen diferencias estadísticamente significativas. Estaría elevada al doble. Se considera que la medida del MDA sería un buen parámetro para asociar con el estrés oxidativo en personas de alta demanda de oxígeno.

La concentración de CPK y LDH muestran un incremento significativo en el grupo de alto nivel con respecto al grupo control, en algunos atletas de grupo control también la podemos encontrar la CPK sobre el rango normal, ya que esta variable sube con el deporte y los dos grupos son deportistas con la diferencia de entrenamiento de intensidad y horas de entrenamiento.



En la regresión lineal múltiple hay variables que no influyen sobre la concentración del MDA, como son la edad, el sexo, el IMC. Y está directamente relacionada con las horas de entrenamiento.

Si aumenta el valor de MDA en el grupo de alto nivel no necesariamente sube la CPK, pero si la LDH. En el grupo control si la MDA sube la CPK también se eleva y la LDH se eleva en menor cantidad.

RECOMENDACIONES

Se sugiere estandarizar los valores de MDA para una población aparentemente sana de nuestro medio, para poder establecer comparaciones con los nuevos estudios que se realicen para investigar estrés oxidativo.

Dentro de los chequeos que se realiza a los atletas de alto nivel, se debería medir el malondialdehído, para conocer si los atletas de alto nivel están sometidos a estrés oxidativo y recomendar como prevenirlo.

Se sugiere a los deportistas aumentar el consumo de alimentos antioxidantes cuando realicen sus entrenamientos en la zona del Cajas, ya que hay investigaciones que prueban que la concentración de malondialdehído se eleva en zonas de mayor altitud sobre el nivel del mar.

Este estudio fue realizado en atletas, y considero que se debería estudiar más a profundidad el estrés oxidativo que se genera al practicar deporte de alto nivel y



se podría extender el estudio a una población mayor de deportistas y así poder evitar repercusiones negativas que pudieran tener a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA Y OTRA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA CITADA.

- Avello, Marcia, & Suwalsky, Mario. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* (Concepción), (494), 161-172. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>
- Aranda Torrelio, E. (2010). Interpretación de la deshidrogenasa láctica. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 49(2), 132-134.
- Baird, M. F., Graham, S. M., Baker, J. S., & Bickerstaff, G. F. (2012). Creatine-kinase-and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *Journal of nutrition and metabolism*, 2012.
- Barranco Ruiz, Y. (2013). Marcadores sanguíneos de envejecimiento por estrés oxidativo inducido por la práctica deportiva: diferencias entre deportistas recreacionales y de élite. Universidad de Granada.
- Bonilla, J., Narváez, R., & Chuaire, L. (2005). El deporte como causa de estrés oxidativo y hemólisis. *Colom med*, 36(4), 275-280.
- Calderón, J. C., Fernández, A. Z., & De Jesús, A. I. M. (2008). Aterosclerosis, Estrés Oxidativo Y Actividad Física. Revisión. *Investigación Clínica*, 49(3).



- Cerrada, F., Briceño, O., González, M., Ruiz, A., Quintero, M., & Flores, R. (2016). Comparación de parámetros hematológicos entre atletas y sedentarios del estado zulia. *Redieluz*, 4(2).
- Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Clin Rev Food Sci Nutr* 1995; 35 (1-2):131-41.
- Clemente, V. J. (2011). Modificaciones de parámetros bioquímicos después de una maratón de montaña. *Motricidad. European Journal of Human Movement*, 27.
- Comission Enzymologie de la Societé Française de Biologie Clinique. *Ann. Biol. Clin.* 40: 123-128 (1982).
- Corrales, A. (2009). Los radicales libres en la actividad física y en el deporte. *EFDeportes. com. Revista Digital. Buenos Aires*, 14.
- Corrales, L. C., & Ariza, M. M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18).
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212.
- De Pinho, R. A., de Araújo, M. C., de Melo Ghisi, G. L., & Benetti, M. (2010). Enfermedad Arterial Coronaria, Ejercicio Físico y Estrés Oxidativo. *Arq Bras Cardiol*, 94(4), 531-537.
- Del Castillo, V. (2000). Antioxidantes, Radicales Libres Y Ejercicio. *Efdeportes.Com, Revista Digital. Buenos Aires*.
- Delgado Roche, L., Martínez Sánchez, G., & Díaz Batista, A. (2009). Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 43(3), 307-313.
- Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E., & Tappel, A. L. (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology*, 45(6), 927-932.
- Estepa, V., Ródenas, S., & Martín, M. C. (2001). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 67, No. 3).
- Estrada-Díaz, S. A., Hernández-Cruz, G., Cruz-Castruita, R. M., Zavala-Flores, L. M., Rodríguez-Bies, E., & Rangel-Colmenero, B. R. (2017). Estrés



- oxidativo y capacidad antioxidante en deportistas con dieta rica en antioxidantes con zarzamora (*Rubus* sp.). *Revista de psicología del deporte*, 26(2).
- Fanning, E., Klimovich, V., & Nager, A. R. (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic acids research*, 34(15), 4126-4137.
- Fernández, J. M., Da Silva-Grigoletto, M. E., & Túnez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio.
- Fisher-Wellman, K., & Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic medicine*, 8(1), 1.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*, 97(3), S5-S13.
- Galván, C., Guisado Barrilao, R., García, M. C., Ochoa, J., & Ocaña Wilhelmí, J. (2008). Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 1(2).
- García-Campanario, I. (2012). Mejora de las Defensas Antioxidantes en Atletas Varones de Alto Rendimiento con Retraso Mental. Tesis de universidades españolas a través del protocolo OAI-PMH. Universidad de Cádiz
- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., & Viña, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 126-131.
- González, C., & García, L. (2012). Physical activity and free radicals, is a supplementation with antioxidants necessary?. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte*, 12(46), 369-388.
- Gutiérrez-Salinas, J., & Cruz-Tovar, L. (2008). Niveles séricos de óxido nítrico y malondialdehído. *Rev Mex Patol Clin*, 55(2), 111-119.
- Hellwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurements, and significance. *Am J Clin Nutr*, 57, 715-725.
- Jackson, M. J. (2008). Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function?. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 132-141.
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515-540.



- Laranza, J. A. D., Rodríguez, C. R., & Trompeta, Y. A. (2016). Diagnóstico de daño muscular y oxidativo en atletas de alto rendimiento en período de pre-entrenamiento. *Rev. Cub. Med. Dep. & Cul. Fís.* Vol. 11, Núm. 1 ISSN: 1728-922X
- Liang, X., Liu, L., Fu, T., Zhou, Q., Zhou, D., Xiao, L., & Lai, L. (2016). Exercise inducible lactate dehydrogenase B regulates mitochondrial function in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M116.
- López, S. (2008). Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev Fac Med UNAM*, 51(3).
- Luciano, J. M. (2013). El Estrés Oxidativo En La Actividad Física Y Deporte. *EF Deportes.Com, Revista Digital*. Año 18-N°182-Julio De 2013. Buenos Aires-Argentina
- Marrugat, J., Arquer, A., & Elosua, R. (2010). Activitat Física I Oxidació Lipídica. *Apunts: Medicina De L'esport*, 45(165), 30-39.
- McAnulty, S. R., McAnulty, L., Pascoe, D. D., Gropper, S. S., Keith, R. E., Morrow, J. D., & Gladden, L. B. (2005). Hyperthermia increases exercise-induced oxidative stress. *International journal of sports medicine*, 26(03), 188-192.
- Mogollón, F. C., & Soto, J. L. P. (2013). Planteamientos Relevantes Sobre El Metabolismo Del Lactato Y Su Relación Con El Ejercicio Físico. *Actividad Física Y Desarrollo Humano*, 4(1).
- Agencia Espacial Ecuatoriana E.X.A. (2018): MNR Monitor Nacional de Radiación Ultravioleta. Disponible en <http://uv.exa.ec/>
- Muñiz, P., Coma, M. J., & Terán, J. Rossi, W. M., Garrido, G., & Sellés, A. J. N. (2016). Biomarcadores Del Estrés Oxidativo En La Terapia Antioxidante. *Journal Of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(2), 62-83.
- Novas, A. J., González, R. M., & Díaz, H. (2007). Estrés oxidativo asociado a la exposición ocupacional a sustancias químicas. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, 8(1), 52-57.
- Núñez Sellés, A. J. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37, 644-660.
- Palacios, G., Pedrero-Chamizo, R., Palacios, N., Maroto-Sánchez, B., Aznar, S., & González-Gross, M. (2015). Biomarcadores de la actividad física y del deporte. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 21(Supl 1), 235-242.



- Pérez, D., Rangel Colmenero, B. R., Hernández Cruz, G., Aguirre Zuazua, H., & Chávez, E. (2014). Control biológico en la fase de competencia y recuperación en un triatleta.
- Peake, J., & Suzuki, K. (2004). Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. *Exerc Immunol Rev*, 10(1), 129-141.
- Pomar, I. G. M., Erquicia, E. B., Colmena, L. T., Barrera, S. Q., & Vargas, P. L. S. (2017). Concentración de malondialdehído en sujetos que residen a gran altitud: estudio exploratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34, 677-681.
- Rangel Colmenero, B. R., Hernández Cruz, G., Maldonado Maldonado, E., Pacheco Ríos, R., & Cárdenas Estrada, E. (2013). Estudio del estrés oxidativo en atletas universitarios. *Revista de Ciencias del Ejercicio FOD*, 8(8), S32.
- Roberts, L. J., & Morrow, J. D. (2000). Measurement of F 2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(4), 505-513.
- Rodenburg, J. B., Bar, P. R., & De Boer, R. W. (1993). Relations between muscle soreness and biochemical and functional outcomes of eccentric exercise. *Journal of Applied Physiology*, 74(6), 2976-2983.
- Rodríguez Perón, J. M., Menéndez López, J. R., & Trujillo López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista cubana de medicina militar*, 30(1), 15-20.
- Rossi, W. M., Garrido, G., & Sellés, A. J. N. (2016). Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(2), 62-83.
- Salinas, J. G. (2007). Función de los complementos antioxidantes durante el ejercicio. *Medicina Interna de México*, 23(3), 217-222.
- Sánchez, I., Torres, V., Moreno, O., & Rodríguez, A. (2011). Determinación del estrés oxidativo mediante peroxidación lipídica en cristalinos humanos con cataratas. *MedULA Revista de Facultad de Medicina*, 20(1), 42-45.
- Sánchez-González, J., Rivera-Cisneros, A., & Luz-Tovar, L. J. (2003). Asociación De Las Respuestas Fisiológicas A Los Cambios Metabólicos En El Ejercicio Físico Extenuante. *Cirugía Y Cirujanos*, 71(3), 217-225.



- Sandoval, A. E. P. (2003). Diagnóstico y prevención de la fatiga crónica o del síndrome de sobreentrenamiento en el deporte de alto rendimiento. Una propuesta de mecanismos de recuperación biológica. *Cuadernos de psicología del deporte*, 3(1).
- Schröder, H. Navarro, E. Tramullas, A. Mora, J. Galiano, D. (1999) Nutrition Antioxidant Status And Oxidative Stress In Professional Basketball Players:
- Schumann, G., Bonora, R., Ceriotti, F., Clerc-Renaud, P., Ferrero, C. A., Féraud, G., & Kanno, T. (2002). IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 40(6), 635-642.
- Souki, A., Cano, C., Mengual, E., García, D., Torres, D., Almarza, J. & Medina, M. (2007). Marcadores biológicos de estrés oxidativo: Distribución por edad y sexo de las concentraciones basales de MDA, NO y ácido úrico en niños y adolescentes de Maracaibo-Venezuela. *Arch. venez. farmacol. ter.*, 26(2), 92-97.
- Torres-León, J. M., Coca-Benito, D., Domínguez-Alegría, A. R., & Chamizo-Alarcón, M. (2016). Rabdomiólisis tras la práctica de spinning: una asociación peculiar. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 9(2), 91-94.
- Tsikas D, Mitschke A, Suchy MT, Gutzki FM, Stichtenoth DO (2005) Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake. *J Chromatogr B* 827:146–156
- Tursi Ríspoli, L. D., Vázquez Tarragón, A., Vázquez Prado, A., Sáez Tormo, G., Ismail, A. M., & Gumbau Puchol, V. (2013). Estrés oxidativo: estudio comparativo entre un grupo de población normal y un grupo de población obesa mórbida. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 671-675.
- Urdampilleta, A., Martínez-Sanz, J. M., & Lopez-Grueso, R. (2013). Valoración bioquímica del entrenamiento: herramienta para el dietista-nutricionista deportivo. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 17(2), 73-83.
- Urso ML, Clarkson PM. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 189(1-2):41-54.



- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Yavari, A., Javadi, M., Mirmiran, P., & Bahadoran, Z. (2015). Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian journal of sports medicine*, 6(1), e24898.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	
<p>Introducción</p> <p>Este formulario incluye un resumen del propósito de este estudio. Usted puede hacer todas las preguntas que quiera para entender claramente su participación y despejar sus dudas. Para participar puede tomarse el tiempo que necesite para consultar con su familia y/o amigos si desea participar o no. Usted ha sido invitado a participar en una investigación sobre estrés oxidativo en deportistas porque usted es un atleta que practica deporte a un nivel de alto nivel o regularmente como amateur. Los radicales libres se producen en los entrenamientos exhaustivos por múltiples razones, al mismo tiempo el cuerpo del deportista como compensación incrementa la producción de sustancias antioxidantes que neutralizan esos radicales libres, cuando esto no sucede y aumenta la cantidad de radicales libres se produce estrés oxidativo y como consecuencia podría causar algún daño en el organismo.</p>	
<p>Propósito del estudio</p> <p>Este estudio tiene como propósito determinar la concentración de malondialdehído (MDA), como indicador de estrés oxidativo provocado por las cargas de entrenamiento en el deporte de alto nivel. Luego evaluar el impacto que podría tener en los deportistas expuestos a altas concentraciones de malondialdehído, y finalmente realizar el análisis estadístico en base a los resultados obtenidos. Se tiene planificado trabajar con 10 deportistas de alto nivel y 20 deportistas amateur como grupo control.</p>	
<p>Descripción de los procedimientos</p> <p>Como primer paso los participantes deben llenar una encuesta con preguntas sobre su práctica deportiva, que le tomará un tiempo de diez minutos.</p> <p>El siguiente paso será la toma de muestra que le tomará unos diez minutos, en donde primero aplicaremos un torniquete, el paciente cierra el puño, se selecciona la vena, se limpia con alcohol, y se realiza la punción, abrimos el torniquete, abre el puño el paciente, extraemos la aguja, se presiona suavemente el lugar de la punción con el algodón con alcohol, se etiqueta el tubo y se trasladan las muestras para su procesamiento.</p>	
<p>Riesgos y beneficios</p> <p>Riesgos: La toma de muestra no le va a traer ningún riesgo para su salud puesto que la cantidad de sangre extraída es mínima y se la realiza en condiciones higiénicas.</p> <p>Beneficios: Si usted participa en el estudio podrá conocer si su nivel de MDA con respecto al grupo control es elevado y prevenir o tomar medidas correctivas para evitar problemas de salud.</p>	

Versión y fecha: (comenzar con el #1, cada modificación será versión n+1)

1




<p>Confidencialidad de los datos</p> <p>Para nosotros es muy importante mantener su privacidad, por lo cual aplicaremos las medidas necesarias para que nadie conozca su identidad ni tenga acceso a sus datos personales:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) La información que nos proporcione se identificará con un código que reemplazará su nombre y se guardará en un lugar seguro donde solo el investigador tendrán acceso. 2) Si se toman muestras de su persona estas muestras serán utilizadas solo para esta investigación y destruidas tan pronto termine el estudio. 3) Su nombre no será mencionado en los reportes o publicaciones. 4) El Comité de Bioética de la Universidad Estatal de Cuenca podrá tener acceso a sus datos en caso de que surgieran problemas en cuando a la seguridad y confidencialidad de la información o de la ética en el estudio.
<p>Derechos y opciones del participante</p> <p>Usted puede decidir no participar y si decide no participar solo debe decírselo al investigador principal o a la persona que le explica este documento. Además aunque decida participar puede retirarse del estudio cuando lo desee, sin que ello afecte los beneficios de los que goza en este momento. Si alguna pregunta durante la encuesta le parece incómoda, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador. Usted no recibirá ningún pago ni tendrá que pagar absolutamente nada por participar en este estudio.</p>
<p>Información de contacto</p> <p>Si usted tiene alguna pregunta sobre el estudio por favor llame al siguiente teléfono 099 640 5647 que pertenece a Liliana Uyaguari, o envíe un correo electrónico a lilianauocana@hotmail.com</p>

<p>Consentimiento informado</p> <p>Yo.....con cédula.....</p> <p>Comprendo mi participación en este estudio. Me han explicado los riesgos y beneficios de participar en un lenguaje claro y sencillo. Todas mis preguntas fueron contestadas. Me permitieron contar con tiempo suficiente para tomar la decisión de participar y me entregaron una copia de este formulario de consentimiento informado. Acepto voluntariamente participar en esta investigación.</p>	
<p>Firma del participante</p>	<p>Fecha</p>
<p>Nombre del investigador que obtiene el consentimiento informado</p>	
<p>Firma del investigador</p>	<p>Fecha</p>



Anexo 2. Encuesta para la clasificación de los deportistas que participan en el estudio de acuerdo a su intensidad de entrenamiento.


**ENCUESTA A PARA LOS DEPORTISTAS DE LA TESIS
SOBRE ESTRÉS OXIDATIVO EN DEPORTISTAS DE LA
CIUDAD DE CUENCA**

1. Nombre: Cédula

3. Edad: 4. Sexo: F M

5. Etnia a la que pertenece: BLANCO MESTIZO AFROAMERICANO INDIGENA

6. ¿Qué tipo de actividad deportiva practica?

7. ¿Cuánto tiempo lleva practicando la actividad deportiva?

8. ¿Cuántas horas al día practica la actividad deportiva?

9. ¿A qué hora del día entrena?

10. ¿Se hidrata durante el entrenamiento? SI NO

11. ¿Su alimentación está dirigida por un nutricionista? SI NO

12. ¿Cuántas horas duerme al día?

13. ¿Su salud la chequea un médico deportólogo? SI NO

14. ¿Toma suplementos nutricionales? SI NO

15. ¿Con qué frecuencia los consume?

16. ¿Ha presentado en las últimas semanas síntomas como cefaleas, molestias gastrointestinales, insomnio? SI NO

17. ¿Ha sentido la necesidad en las últimas semanas de auto aislamiento y de no realizar actividad? SI NO

18. ¿Ha tenido en las últimas semanas situaciones emocionales como depresión, enojo, falta de energía? SI NO

19. ¿Cuánto tiempo ha estado en ciudades de altura como Cuenca en las últimas semanas?

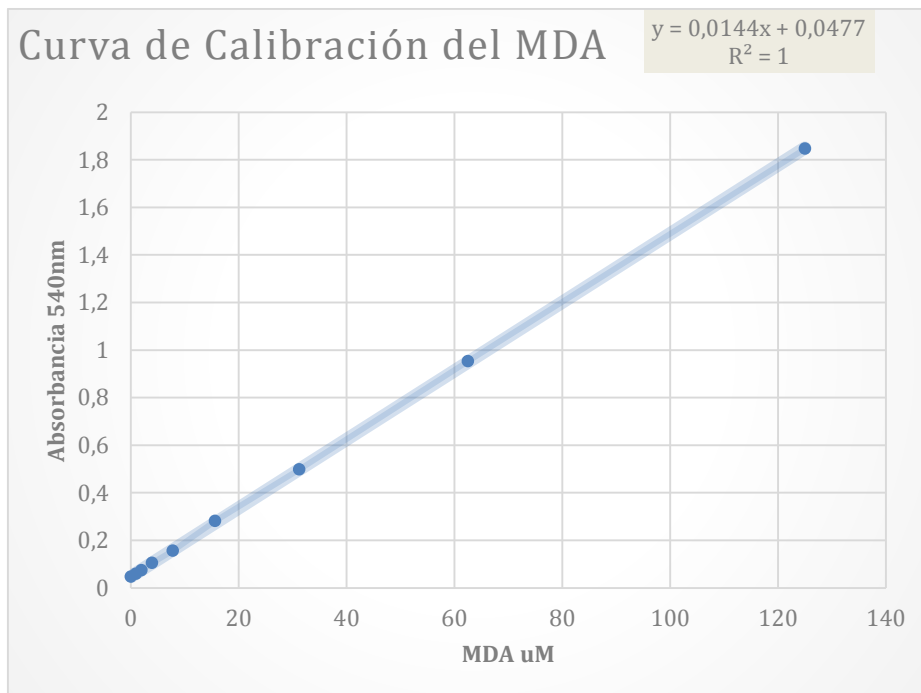
20. ¿Ha recibido medicamentos en las últimas semanas y cuáles?

21. Ha sido intervenido quirúrgicamente o sometido a rehabilitación por alguna lesión?
SI NO

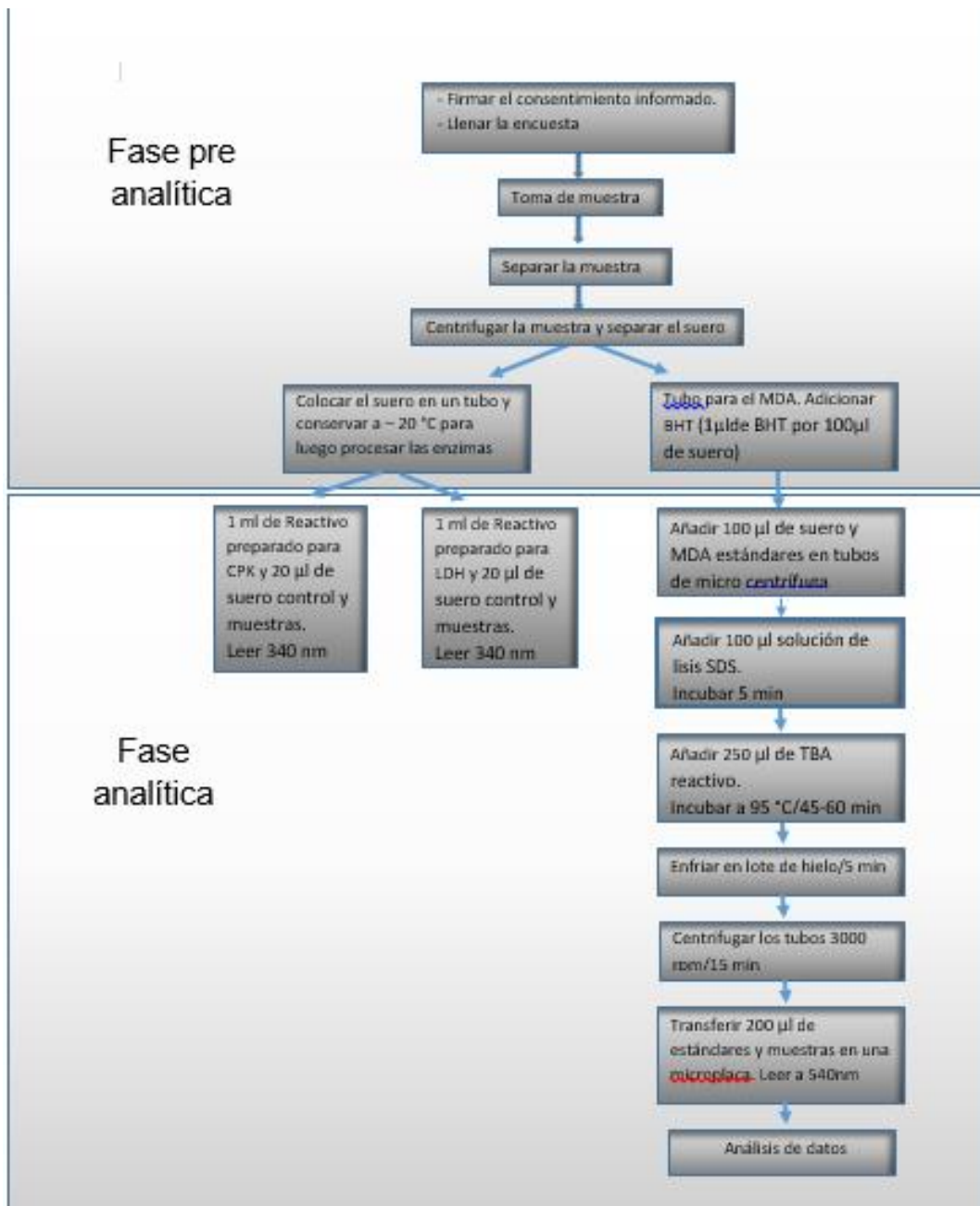
Toda la información proporcionada en esta encuesta será tratada de manera confidencial, no será difundida sin su consentimiento. Gracias por su colaboración

Anexo 3. Curva de calibración del MDA

Concentración μM	Absorbancia 340nm
125	1,846
62,5	0,952
31,25	0,498
15,63	0,281
7,81	0,156
3,91	0,105
1,95	0,073
0,98	0,059
0	0,047



Anexo 4. Flujograma de procedimiento para el análisis de MDA, CK y DHL





Anexo 5. Materiales, equipos y reactivos que se usarán en el estudio

Materiales de Laboratorio	Tubos vacutainer tapa roja
	Torniquete
	Agujas #20G
	Algodón, alcohol
	pipetas automáticas, Human 5 μ L.10 μ L.20 μ L,100 μ L,500 μ L
	puntas amarillas y azules
	Gradillas acrílicas
Equipos de Laboratorio	Centrífuga, Thermo Scientific, USA
	microcentrífuga Thermo Scientific E-FLU-0.23, USA
	vortex
	Baño maría Gemmy Industrial Corp YCW-010, Taiwan
	Balanza analítica DUMettler Toledo XA 105, España
	pH-metro,
	Cabina de bioseguridad, Labconco, USA
	Congelador -80 °C, Thermo Scientific
	Lector de placas Bio Tek E-EG-001, Germany
Espectrofotómetro Stat fax 1904 Plus, USA	
Reactivos	CK NAC liquidUV HUMAN
	LDH SCE mod. liquidUV HUMAN
	OxiSelect TBARS Assay Kit (MDA)



ANEXO 6. Características demográficas, epidemiológicas y clasificación de los atletas que participan en el estudio de acuerdo a su intensidad de entrenamiento, además de la concentración de MDA, CK y DHL

Alto nivel													
CODIGO	GENERO	EDAD	MDA uM	CPK U/L	LDH U/L	IMC	AÑOS DE ENTRENA	HORAS DE ENTREN	CEFALEA/INSOMNIO	DEPRESION/FALTA	MEDICAMENTOS	HORAS DE SUEÑO	
1	M	33	5,09	286,0	367,9	22,7	4	3	NO	NO	NO	7	
2	M	25	7,45	345,0	390,3	21,2	7	4	NO	NO	NO	7	
3	F	23	6,756	380,4	468,5	21,6	8	3	NO	NO	NO	7,3	
4	F	25	6,895	272,4	489,1	19,9	17	7	NO	SI	NO	10	
5	M	30	5,437	182,6	334,4	19,2	12	8	NO	NO	NO	8	
6	M	22	7,5902	665,3	569,8	23,5	8	3	NO	SI	NO	6	
7	M	19	11,34	330,4	548,2	22,0	4	3	NO	SI	NO	10	
8	M	19	7,381	688,1	526,5	19,9	10	4	NO	NO	NO	8,3	
9	F	31	6,965	682,2	501,3	20,8	20	4	NO	NO	NO	8	
10	F	36	6,131	296,7	330,5	24,4	1	4	NO	NO	NO	7	
Grupo control													
CODIGO	GENERO	EDAD	MDA uM	CPK U/L	LDH U/L	IMC	AÑOS DE ENTRENAMIENTO	HORAS DE ENTREN	CEFALEA/INSOMNIO	DEPRESION/FALTA DE ENER	MEDICAMENTOS	HORAS DE SUEÑO	
11	M	40	2,381	104,1	310,1	22,0	3	2	NO	NO	NO	7	
12	M	42	3,006	83,2	324,5	28,2	5	2	NO	NO	NO	8	
13	M	43	1,895	96,2	273,3	26,3	4	1,3	NO	NO	NO	7	
14	M	30	4,395	181,1	473,7	23,9	5	2	NO	NO	NO	7	
15	F	48	3,77	252,1	241,8	20,3	2	2	NO	NO	NO	6	
16	F	36	3,701	333,8	377,1	21,4	1	2	NO	NO	NO	8	
17	M	19	3,354	276,7	309,4	19,7	1	2	SI	SI	NO	7	
18	M	18	2,868	222,6	364,6	19,6	8	2	SI	SI	NO	7,3	
19	M	19	4,881	221,9	358,7	22,4	5	2	NO	SI	NO	8	
20	M	18	4,951	337,4	335,1	21,3	8	2,3	NO	NO	NO	8	
21	M	24	2,034	163,2	467,8	24,5	3	2	NO	NO	NO	7	
22	F	30	2,52	113,1	241,8	19,5	1	1,3	SI	SI	NO	7	
23	M	40	1,27	240,9	375,8	22,5	3	2	NO	NO	NO	7	
24	M	25	1,895	176,8	344,9	20,7	5	2	NO	NO	NO	8	
25	M	38	0,923	83,6	322,6	26,7	3	1,3	SI	SI	NO	6	
26	M	20	1,479	260,8	286,4	21,6	5	2	SI	SI	NO	6	
27	M	36	1,82	105,8	434,9	23,5	6	4	NO	NO	NO	9	
28	M	33	5,645	363,6	387,0	19,2	15	2	SI	SI	NO	5	
29	F	24	5,02	293,6	457,3	20,4	12	4	NO	NO	NO	8	
30	F	25	4,881	271,0	328,5	19,8	2	2	NO	NO	NO	7	

Anexo 7. Registro fotográfico

Foto1. Tratamiento de la muestra



Foto 2. Kit de Reactivo



Foto 3, Congelador -80 °C



Foto 4. Balanza analítica. Pesado de reactivo TBA

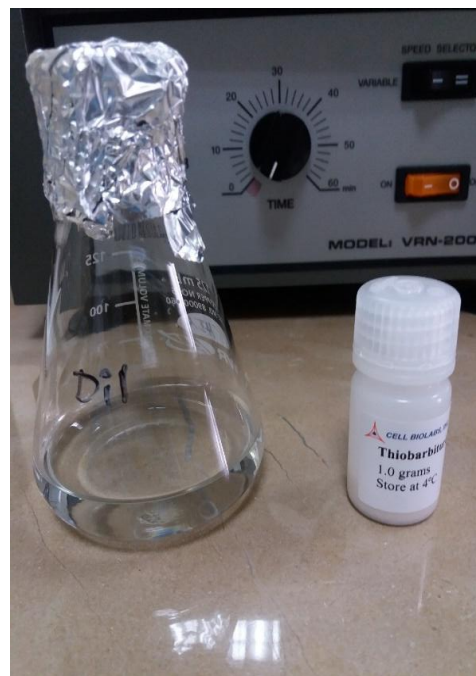
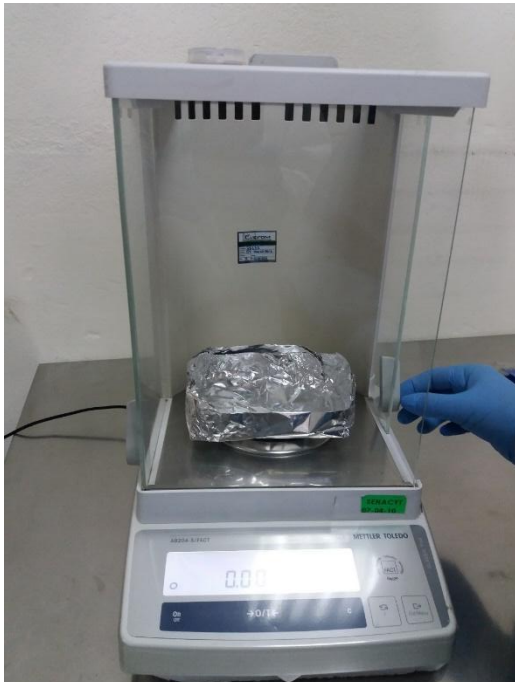


Foto 5. Ajuste a pH 3.5 del reactivo TBA con NaOH al 10%



Foto 6. TBA en tubos de muestras y patrones

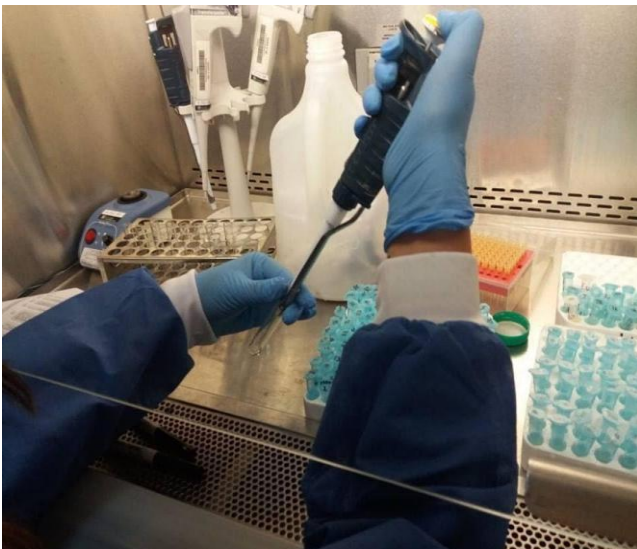


Foto 7. Muestras en Baño María 95 °C y enfriamiento en baño de hielo



Foto 8. Microcentrífuga para tubos eppendorf



Foto 9. Microplacas con muestras para la lectura

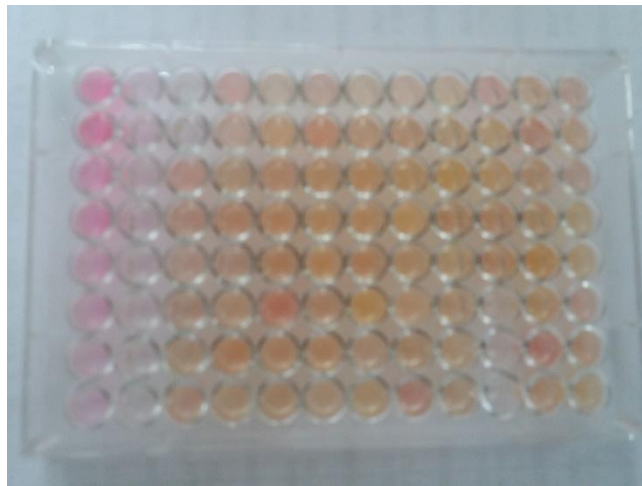


Foto 10. Equipo de lectura de microplacas



Foto 11 Kit de Reactivo de CPK



Foto 12. Kit de Reactivo de LDH



Foto 13. Humatrol N



Foto 14. Espectrofotómetro Stat fax 1904 Plus





Anexo 8. Inserto del reactivo de MDA

Product Manual

OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)

Catalog Number

STA-330	200 assays
STA-330-5	5 x 200 assays

FOR RESEARCH USE ONLY
Not for use in diagnostic procedures



Introduction

Lipid peroxidation is a well-defined mechanism of cellular damage in animals and plants. Lipid peroxides are unstable indicators of oxidative stress in cells that decompose to form more complex and reactive compounds such as Malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE), natural bi-products of lipid peroxidation. Oxidative modification of lipids can be induced *in vitro* by a wide array of pro-oxidant agents and occurs *in vivo* during aging and in certain disease conditions. Measuring the end products of lipid peroxidation is one of the most widely accepted assays for oxidative damage. These aldehydic secondary products of lipid peroxidation are generally accepted markers of oxidative stress.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) is a well-established assay for screening and monitoring lipid peroxidation. The rapid and easy protocol has been modified by researchers in the evaluation of drugs, food, as well as human and animal tissue samples. MDA forms a 1:2 adduct with thiobarbituric acid (Figure 1). The MDA-TBA adduct formed from the reaction of MDA in samples with TBA can be measured colorimetrically or fluorometrically. TBARS levels are determined from a Malondialdehyde equivalence standard.

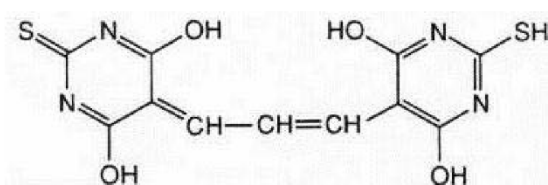


Figure 1. MDA-TBA Adduct

The TBARS Assay has provided relevant information concerning free radical activity in disease states and measurement of many compounds anti-oxidant characteristics. Although the specificity of TBARS toward compounds other than MDA has been controversial, the assay continues to be the most widely employed format for monitoring lipid peroxidation. Lipids with higher degrees of unsaturated bonds produce higher TBARS values. Interfering soluble TBARS can be minimized if lipoprotein fractions are first acid precipitated from samples. Biological samples may contain a mixture of thiobarbituric acid reactive substances such as hydroperoxides and aldehydes, which increase in response to oxidative stress. If excessively high TBARS values are obtained, a more specific assay such as HPLC should be employed.

The OxiSelect™ TBARS Assay Kit offers a simple, reproducible, and consistent system for the detection of lipid peroxidation in urine, plasma, serum, lysates, and tissue homogenates. This kit includes an MDA standard for use as a positive control. Each kit provides sufficient reagents to perform 200 tests including standard curve and unknown samples.

Assay Principle

The Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Assay Kit is a tool for the direct quantitative measurement of MDA in biological samples. The unknown MDA containing samples or MDA standards are first reacted with TBA at 95°C. After a brief incubation, the samples and standards can



be read either spectrophotometrically or fluorometrically. The MDA content in unknown samples is determined by comparison with the predetermined MDA standard curve.

Related Products

1. STA-316: OxiSelect™ N-epsilon-(Carboxymethyl) Lysine (CML) ELISA Kit
2. STA-317: OxiSelect™ Advanced Glycation End Products (AGE) ELISA
3. STA-320: OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation)
4. STA-325: OxiSelect™ Oxidative RNA Damage ELISA Kit (8-OHG Quantitation)
5. STA-331: OxiSelect™ MDA Immunoblot Kit
6. STA-332: OxiSelect™ MDA ELISA Kit
7. STA-333: MDA-BSA Control
8. STA-334: OxiSelect™ HNE Adduct ELISA Kit
9. STA-335: HNE-BSA Control
10. STA-337: OxiSelect™ 8-iso-Prostaglandin F2a Activity Assay Kit
11. STA-344: OxiSelect™ Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit
12. STA-347: OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence)

Kit Components

1. MDA Standard (Part No. 233001): One amber vial of 1.0 mM Malondialdehyde bis(dimethyl acetal) – 1.0 mL
2. Thiobarbituric Acid (TBA) (Part No. 233002): One bottle – 1.0 gram
3. SDS Lysis Solution (Part No. 233003): One bottle – 20 mL
4. 2X TBA Acid Diluent (Part No. 233004): One bottle – 25 mL
5. Sodium Hydroxide Solution (Part No. 233005): One bottle – 5 mL
6. 100X BHT Solution (Part No. 233006): One vial of 5% Butylated hydroxytoluene (BHT) in methanol – 1.0 mL

Materials Not Supplied

1. MDA samples: plasma, serum, urine, tissue or cell lysate
2. Microcentrifuge and conical tubes
3. Heat block, incubator or water bath
4. n-Butanol
5. 96-well clear, flat-bottomed microplate for reading samples/standards
6. 96-well black fluorescence microplate for reading samples/standards



7. Spectrophotometric microplate reader capable of reading at 532nm
8. Fluorometric microplate reader capable of reading at 540nm excitation and 590nm emission

Storage

Store all components at 4°C until their expiration dates.

Preparation of Reagents

- 1X TBA Acid Diluent: Dilute the 2X TBA Diluent 1:2 with distilled or deionized water.
- SDS Lysis Solution: If precipitated crystals are present, briefly heat the solution at 37°C to redissolve the SDS crystals.
- TBA Reagent: Prepare the TBA Reagent just before use. Prepare a 5.2 mg/mL solution of TBA Reagent by weighing out an amount of TBA needed for all samples and standards (eg: 130 mg of TBA is enough to prepare 100 tests). Add 1X TBA Acid Diluent (see above) to the TBA and stir or mix vigorously until the powder has dissolved (eg: 25 mL 1X TBA Diluent for 130 mg of TBA). Adjust the pH of the solution to pH 3.5 with the Sodium Hydroxide Solution.

Note: The TBA Reagent is stable for 24 hours. Do not store or reuse diluted solutions.

- 1X BIIT Solution: Add antioxidant BIIT at 1X final to each test sample to prevent further oxidation of lipid during sample processing and the TBA reaction.

Preparation of Samples

Important Note: All samples should be assayed immediately or stored at -80°C for up to 1-2 months.

- Tissue: Because hemoglobin interferes with the assay, blood should be removed from tissue sample by perfusion with PBS containing heparin. Resuspend tissue at 50 to 100 mg/mL in PBS containing 1X BHT. Homogenize the tissue sample on ice, spin at 10,000 g for 5 min to collect the supernatant. The supernatant can be assayed directly for its TBARS level and results can be normalized based on its protein concentration.
- Plasma: To minimize the hemoglobin interference, prepare the plasma sample as soon as possible after blood being drawn. Add 1X BHT to plasma sample to prevent further oxidation. Plasma sample can be assayed directly without further processing.
- Cells: Resuspend cells at $1-2 \times 10^7$ cells/mL in PBS containing 1X BIIT. Homogenize or sonicate the cells on ice. Use the whole homogenate in the assay.
- Urine: To remove insoluble particles, spin at 10,000 g for 5 min. The supernatant can be assayed directly.



Preparation of Standard Curve

Prepare a dilution series of MDA standards in the concentration range of 125 μM – 0 μM by diluting the MDA Standard in distilled or deionized water (Table 1). It is recommended that standards be performed in duplicate.

Standard Tubes	MDA Standard (μL)	Water (μL)	MDA Standard (μM)
1	125 μL	875 μL	125
2	250 μL of Tube #1	250 μL	62.5
3	250 μL of Tube #2	250 μL	31.25
4	250 μL of Tube #3	250 μL	15.63
5	250 μL of Tube #4	250 μL	7.81
6	250 μL of Tube #5	250 μL	3.91
7	250 μL of Tube #6	250 μL	1.95
8	250 μL of Tube #7	250 μL	0.98
9	0 μL	250 μL	0.0

Table 1. Preparation of MDA Standards

Assay Protocol

1. Prepare and mix all reagents thoroughly before use. Each MDA-containing sample and standard should be assayed in duplicate. High content MDA samples can be further diluted for analysis.
2. Add 100 μL of unknown samples or MDA standards to separate microcentrifuge tubes.
3. Add 100 μL of the SDS Lysis Solution to both the unknown samples and the MDA standards. Mix thoroughly. Incubate samples for 5 minutes at room temperature.
4. Add 250 μL of TBA Reagent to each sample and standard to be tested.
5. Close each tube and incubate at 95°C for 45-60 minutes.
6. Remove tubes and cool to room temperature in an ice bath for 5 minutes.
7. Centrifuge all sample tubes at 3000 rpm for 15 minutes. Remove the supernatant from samples for further analysis.
8. (optional) Butanol Extraction: To prevent the interference of hemoglobin and its derivatives, we recommend the following extraction procedure:
 - a. Transfer 300 μL of the supernatant (Step 7) to another tube, add 300 μL of n-Butanol. Vortex vigorously for 1-2 minutes and centrifuge for 5 minutes at 10,000 g.
 - b. Transfer the butanol fraction for further measurement.
9. Spectrophotometric Measurement: Transfer 200 μL of the MDA standards and samples to a 96 well microplate compatible with a spectrophotometric plate reader. Remember to include a 0 μM

blank control. It is recommended that duplicates of each standard and sample should be read. Read the absorbance at 532nm.

Fluorometric Measurement: Transfer 150 μ L of the MDA standards and samples to a 96 well black fluorescence microplate compatible with a fluorometric plate reader. Remember to include a 0 μ M blank control. It is recommended that duplicates of each standard and sample should be read. Read the plate at 540 nm excitation and 590 nm emission.

Example of Results

The following figures demonstrate typical MDA Quantitation results by TBARS Assay Kit. One should use the data below for reference only. This data should not be used to interpret actual results.

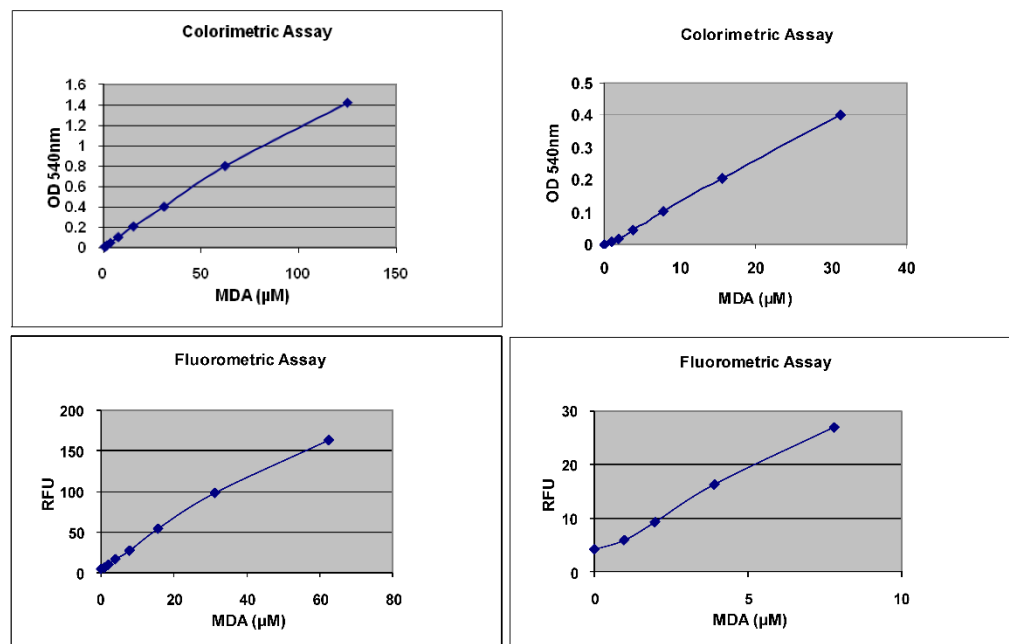


Figure 2. MDA Standard Curve. The MDA standard curve was created as described in the Assay Protocol. Top Panel: Colorimetric Detection; Bottom Panel: Fluorometric Detection.

References

1. Armstrong, D. and Browne, R. (1994). *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. 366: 43-58.
2. Armstrong, D., et al. (1998). *Free Radicals and Antioxidant Protocols*. 108: 315-324.
3. Boyum, A. (1966). *J. of Clinical Investigation*. 21: Supplement 97.
4. Braun, D. and Fromherz, P. (1997). *Applied Physics A*.



5. Gidez, L., et al. (1982). *J. of Lipid Research*. 23: 1206-1223.
6. Lefevre G., et al. (1998). *Annals de Biologie Clinique*. 56(3): 305-319.
7. Ohkawa, H., et al. (1979). *Anal. Biochem*. 95: 351-358.
8. Yagi, K. (1998). *Free Radicals and Antioxidant Protocols*. 108: 101-106.

Recent Product Citations

1. Fu, L. et al. (2012). Ethyl Pyruvate Reduces Ventilation-Induced Neutrophil Infiltration and Oxidative Stress. *J. Lipid Res.* : 1080-1092.
2. Brindeiro, C.M. et al.(2012).Tempol Prevents Altered K⁺ Channel Regulation of Afferent Arteriolar Tone in Diabetic Rat Kidney. *Hypertension*.59:657 - 664.
3. Joshi, S. G. et al. (2011). Nonthermal Dielectric-Barrier Discharge Plasma-Induced Inactivation Involves Oxidative DNA Damage and Membrane Lipid Peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:1053-1062.
4. Kasaikina, M.V. et al. (2011). Roles of the 15-kDa Selenoprotein (Sep15) in Redox Homeostasis and Cataract Development Revealed by the Analysis of Sep 15 Knockout Mice. *J. Biol. Chem.* 286:33203-33212.
5. Fedeles, B. I. et al. (2011). Chemical Genetics Analysis of an Aniline Mustard Anticancer Agent Reveals Complex I of the Electron Transport Chain as a Target. *J. Biol. Chem.* 286:33910-33920.
6. Song, Y.R. et al. (2010). Activation of Hypoxia-Inducible Factor Attenuates Renal Injury in Rat Remnant Kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25:77-85.
7. Wojciechowski, P. et al. (2010). Resveratrol Arrests and Regresses the Development of Pressure Overload- but Not Volume Overload-Induced Cardiac Hypertrophy in Rats. *J. Nutr.* 140:962-968.
8. Kwon, H. et al. (2010). Vitamin D₃ Upregulated Protein 1 Suppresses TNF- α -Induced NF- κ B Activation in Hepatocarcinogenesis. *J. Immunol.* 185:3980-3989.
9. Fomenko, D.E. et al. (2008). Methionine-R-sulfoxide reductase 1 (MsrB1) Knockout Mice: Roles of MsrB1 in Redox Regulation and Identification of a Novel Selenoprotein form. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M805770200.
10. Fujita, K. et al. (2008). Effectiveness of Antiplatelet Drugs Against Experimental Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gut* 57:1583-1591.

Warranty

These products are warranted to perform as described in their labeling and in Cell Biolabs literature when used in accordance with their instructions. THERE ARE NO WARRANTIES THAT EXTEND BEYOND THIS EXPRESSED WARRANTY AND CELL BIOLABS DISCLAIMS ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR WARRANTY OF FITNESS FOR PARTICULAR PURPOSE. CELL BIOLABS' sole obligation and purchaser's exclusive remedy for breach of this warranty shall be, at the option of CELL BIOLABS, to repair or replace the products. In no event shall CELL BIOLABS be liable for any proximate, incidental or consequential damages in connection with the products.



Contact Information

Cell Biolabs, Inc.
7758 Arjons Drive
San Diego, CA 92126
Worldwide: +1 858-271-6500
USA Toll-Free: 1-888-CBL-0505
E-mail: tech@cellbiolabs.com
www.cellbiolabs.com

©2007-2012: Cell Biolabs, Inc. - All rights reserved. No part of these works may be reproduced in any form without permissions in writing.



Anexo 9. Inserto del reactivo de CPK

CK NAC liquiUV

Liquid NAC activated UV Test Creatine Kinase (EC 2.7.3.2)

Package Size
REF 12015 10 x 10 ml Complete test kit
IVD

Method^{1,5,6}
Modified standard method according to the recommendations of ECCLS (European Committee for Clinical Laboratory Standards) and of the IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

Reaction Principle

$$\text{Creatine phosphate} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{CK}} \text{creatine} + \text{ATP}$$

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{HK}} \text{glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucose-6-P} + \text{NADP} \xrightleftharpoons{\text{G6P-DH}} \text{gluconate-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Contents

[ENZ] 10 x 8 ml Enzymes	
Imidazole buffer (pH 6.2)	125 mmol/l
Glucose	25 mmol/l
Magnesium acetate	12.5 mmol/l
EDTA	2.5 mmol/l
AMP	6.25 mmol/l
N-acetylcysteine	0.25 mmol/l
Diadenosine pentaphosphate	12.5 µmol/l
NADP	2.5 mmol/l
HK	≥ 5 U/ml
SH-stabiliser	31.25 mmol/l
Sodium azide	0.095 %
[SUB] 2 x 10 ml Substrate	
ADP	10 mmol/l
G6P-DH	≥ 14 U/ml
Creatine phosphate	150 mmol/l
Sodium azide	0.095 %

Reagent Preparation
[ENZ] and [SUB] are ready to use for the substrate start method.
To prepare the Working reagent, mix 4 parts [ENZ] with 1 part [SUB], e.g. 8 ml [ENZ] + 2 ml [SUB].

Reagent Stability
The reagents [ENZ] and [SUB] are stable up to the stated expiry date when sealed and stored at 2...8°C. After opening the reagents are stable for 30 days at 2...8°C. Contamination of the reagents must be avoided.
The Working reagent is stable for 30 days at 2...8°C and for 3 days at 15...25°C.

Specimen
Serum, heparinised plasma (lithium heparin)
Loss of activity within 7 days at +4°C or within 24 hours at +25°C: 2%.

Assay
Wavelength: Hg 365 nm, 340 nm or Hg 334 nm
Optical path: 1 cm
Temperature: 25°C, 30°C or 37°C
Measurement: against air (increasing absorbance)

Pipetting Scheme for Sample Start:
Bring working reagent to the desired temperature and keep the temperature constant (± 0.5°C) for the duration of the test.

Pipette into cuvettes	25°C, 30°C	37°C
Sample	50 µl	25 µl
Working reagent	1000 µl	1000 µl

Mix and incubate at the desired temperature for 5 minutes. Read the absorbance and at the same time start the stopwatch. Read the absorbance again exactly after 1, 2 and 3 minutes.

Pipetting Scheme for Reagent Start:
Bring reagents [ENZ] and [SUB] to the desired temperature and keep the temperature constant (± 0.5°C) for the duration of the test.

Pipette into cuvettes	25°C/30°C	37°C
Sample	50 µl	25 µl
[ENZ]	1000 µl	1000 µl

Mix, incubate 3 minutes at the desired temperature.
[SUB] 250 µl 250 µl
Mix and incubate for 3 minutes. Read the absorbance and at the same time start the stopwatch. Read the absorbance again exactly after 1, 2 and 3 minutes.

Calculation
Calculate the mean absorbance change per minute (ΔA/min) and multiply ΔA/min with the following factors to get the activity in the sample:

Wavelength	Sample start		Reagent start	
	25°C, 30°C	37°C	25°C, 30°C	37°C
Hg 334 nm	3398	6634	4207	8252
340 nm	3333	6508	4127	8095
Hg 365 nm	6000	11714	7429	14572

Conversion factor of traditional units (U/l) into SI-units (kat/l):
1 U/l = 16.67 x 10⁻³ µkat/l
1 µkat/l = 60 U/l

Performance Characteristics
Linearity
If the absorbance change per minute (ΔA/min) exceeds
Hg 334 nm/340 nm: ΔA/min = 0.200
Hg 365 nm: ΔA/min = 0.110
dilute 0.1 ml of the sample with 1.0 ml physiological saline (0.9%) and repeat the assay using this dilution. Multiply the results by 11.
Typical performance data can be found in the Verification Report accessible via
www.human.de/data/gb/vr/en-ckluv.pdf or
www.human-de.com/data/gb/vr/en-ckluv.pdf

Reference Values^{2,3}

Temperature	25°C	30°C	37°C	IFCC
Men	10...80 U/l	15...125 U/l	24...190 U/l	≤ 171
Women	10...70 U/l	15...110 U/l	24...170 U/l	≤ 145


Quality Control
All control sera with CK NAC-act. values determined by this method can be employed. We recommend to use our animal serum made HumaTrol or our human serum based SERODOS quality control sera.

Automation
Proposals to apply the reagents on analysers are available on request. Each laboratory has to validate the application in its own responsibility.

Note
If plasma is used, different CK values may be found.

Safety Notes
[ENZ] Danger
• Hazard statements
H360D May damage the unborn child.
• Precautionary statements
P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P201 Obtain special instructions before use.
P202 Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.
P405 Store locked up.
P501 Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

References
1. Schumann, G. *et al.*, Clin Chem Lab Med, **40**, 635-642 (2002)
2. Schumann, G. *et al.*, Clin Chem Acta, **327**, 69-79 (2003)
3. Tietz, N. W. (ed.), Clinical Guide to Laboratory Test; 3rd edition, WB Saunders Co, (1995)
4. Chemnitz, G. *et al.*, Dtsch. med. Wschr. **104**, 257 (1977)
5. Klauke, R. *et al.*, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **15**, 901-909 (1993)
6. Horder, M. *et al.*, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **29**, 435 (1991)
7. Thomas, L., Labor und Diagnose, 8. ed., TH-Books, 105-111 (2012)
8. DGKL, Die Qualität diagnostischer Proben, 7. ed., Heidelberg (2012)

EN-CKLUV INF 1201501 GB 10-2016-11 

Human

Human Gesellschaft für Biochemia und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
Telefon +49 6122-9988-0 · Telefax +49 6122-9988-100 · e-Mail human@human.de



Anexo 70. Inserto del reactivo de LDH

LDH SCE mod. liquiUV
Lactate Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)

Package Sizes

REF	12214	16 x 5 ml	Complete M-Test Kit
	12014	10 x 10 ml	Complete Test Kit
	12024	8 x 50 ml	Complete Test Kit

IVD

Method¹
"Modified method" based on the recommendations of the SCE (Scandinavian Committee on Enzymes).

Principle

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Lactate} + \text{NAD}^+$$

Contents

REF	12214	12014	12024
BUF	16 x 4 ml	10 x 8 ml	8 x 40 ml
SUB	1 x 16 ml	2 x 10 ml	8 x 10 ml
BUF	Buffer/Substrate		
	TRIS buffer (pH 7.35)		62.5 mmol/l
	Pyruvate		1.5 mmol/l
	Sodium azide		0.095 %
SUB	Substrate		
	NADH		0.75 mmol/l
	Sodium azide		0.095 %

Reagent Preparation

Procedure 1 with reagent start
The reagents are ready for use.
The reagents are stable, even after opening, up to the stated expiry date when stored at 2...8°C. [BUF] must be kept light protected. Contamination of the reagents must be avoided!

Procedure 2 with sample start

REF 12024: Pour the entire contents of one bottle [SUB] into one bottle [BUF], mix thoroughly.
REF 12214: Pipette 1 ml from bottle [SUB] into one bottle [BUF], mix thoroughly.
REF 12014: Pipette 2 ml from bottle [SUB] into one bottle [BUF], mix thoroughly.

The working reagent is stable for 3 weeks at 2...8°C and 3 days at 15...25°C. The working reagent must be kept light protected.

Specimen
Serum, heparinised or EDTA plasma.
Avoid hemolysis!
Loss of activity within 3 days 8% at +4°C, 2% at 15...25°C.

Assay
Wavelength: Hg 334 nm, 340 nm, Hg 365 nm
Optical path: 1 cm
Temperature: 25°C, 30°C or 37°C
Measurement: against air (decreasing absorbance)

Warm the reagents and the cuvettes to the desired temperature. Temperature must be kept constant (± 0.5°C) for the duration of the test.

Procedure 1*

Pipette into cuvettes	25°C, 30°C	37°C
Sample	20 µl	10 µl
[BUF]	1000 µl	1000 µl
Mix, incubate for 1 - 5 min. at 25°C, 30°C or 37°C.		
[SUB]	250 µl	
Mix, read the absorbance after 1 minute and at the same time start the stop watch. Read the absorbance again exactly after 1, 2 and 3 minutes.		

Procedure 2*

Pipette into cuvettes	25°C, 30°C	37°C
Sample	20 µl	10 µl
Working reagent	1000 µl	1000 µl
Mix, read the absorbance after 1 minute and at the same time start the stop watch. Read the absorbance again exactly after 1, 2 and 3 minutes.		

* Semi-micro method; for macro methods double the volumes.

Calculation
Using the absorbance readings calculate the mean absorbance change per minute (ΔA/min).
Calculate the LDH activity in the sample by multiplying ΔA/min using the following factors:

Procedure 1

	Hg 334 nm	340 nm	Hg 365 nm
U/l (25°C, 30°C) = ΔA/min. x	10275	10080	18675
U/l (37°C) = ΔA/min. x	20390	20000	37060

Procedure 2

	Hg 334 nm	340 nm	Hg 365 nm
U/l (25°C, 30°C) = ΔA/min. x	8250	8095	15000
U/l (37°C) = ΔA/min. x	16345	16030	29705

Conversion factor of the traditional units (U/l) in SI-units (kat/l):
1 U/l = 16.67 x 10⁻³ µkat/l
1 µkat/l = 60 U/l

Factor to convert results to the new IFCC recommended method:
U/l (LDH SCE) x 0.4796 = U/l (LDH IFCC).

Performance Characteristics

Linearity
If the absorbance change per minute (ΔA/min.) exceeds 0.150 at Hg 334 nm, 340 nm or 0.070 at Hg 365 nm dilute 0.1 ml of the sample with 0.9 ml physiological saline (0.9%) and repeat the assay using this dilution. Multiply the result by 10.
Typical performance data can be found in the Verification Report, accessible via:
www.human.de/data/gb/vr/en-ldhuv.pdf
www.human-de.com/data/gb/vr/en-ldhuv.pdf

Reference Values^{2,3}

Temperature	25°C	30°C	37°C	IFCC ⁴
Adults [U/l]	120-240	160-320	225-450	
Men [U/l]				< 243
Women [U/l]				< 244
Children [U/l] (up to 12 months)	up to 500			

Quality Control
All control sera with LDH values determined by this method can be employed.
We recommend to use our animal serum based HumaTrol or our human serum based SERODOS quality control sera.

Automation
Proposals to apply the reagents on analysers are available on request. Each laboratory has to validate the application in its own responsibility.

Note
[BUF] and [SUB] contain sodium azide (0.095%). Do not swallow. Avoid contact with skin and mucous membranes.

References

- Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. **8**, 658 (1970), 10, 182 (1972)
- Weißhaar, D. et al., Med. Welt **26**, 387 (1975)
- Witt, I., Trendelenburg, C., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **20**, 235 - 242 (1982)
- Schumann G. et al., Clin.Chem.Lab.Med. **40**, 643-648 (2002)

EN-LDHUV INF 1221401 GB 02-2018-18

CE

Human

Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
Telefon +49 6122-9988-0 · Telefax +49 6122-9988-100 · e-Mail human@human.de

Anexo 11. Certificado del INSPI

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA INSPi
DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ

COORDINACIÓN ZONAL 6

Cuenca, 13 de Julio del 2018

A quien corresponda

Por medio de la presente, me permito comunicar que la Dra. Liliana Uyaguari Ocaña realizó los análisis de las muestras para la determinación del malondialdehído para su tesis titulada, "Riesgo toxicológico por estrés oxidativo en deportistas de alto nivel de la ciudad de Cuenca", en el laboratorio del Centro de Referencia de Retrovirus, hepatitis y otros virus de transmisión sexual del INSPi-Dr. Leopoldo Izquieta Pérez CZ6.

Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y autorizo a la Dra. Liliana Uyaguari hacer uso de este documento como a bien tuviere.

Sin otro particular suscribo de usted.

Atentamente,



Dra. María Cristina Pacurucu
Coordinadora Zonal 6 INSPi "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez"



Av. Huayna Cápac 1-212
Teléfono: 074109232 - 074109203 - 07419305
www.investigacionssalud.gob.ec

Anexo 12. Informe de resultados del MDA

Cuenca, 30 de Abril del 2018

INFORME DE RESULTADOSREALIZADO POR: DRA. LILIANA UYAGUARI OCAÑA
BQF. MARIA ELIZABETH CAMPOVERDE**CONCENTRACION DE MALONDIALDEHIDO (MDA)**

MUESTRA 1	5,09
MUESTRA 2	7,45
MUESTRA 3	6,756
MUESTRA 4	6,895
MUESTRA 5	5,437
MUESTRA 6	7,5902
MUESTRA 7	11,34
MUESTRA 8	7,381
MUESTRA 9	6,965
MUESTRA 10	6,131
MUESTRA 11	2,381
MUESTRA 12	3,006
MUESTRA 13	1,895
MUESTRA 14	4,395
MUESTRA 15	3,77
MUESTRA 16	3,701
MUESTRA 17	3,354
MUESTRA 18	2,868
MUESTRA 19	4,881
MUESTRA 20	4,951
MUESTRA 21	2,034
MUESTRA 22	2,52
MUESTRA 23	1,27
MUESTRA 24	1,895
MUESTRA 25	0,923
MUESTRA 26	1,479
MUESTRA 27	1,82
MUESTRA 28	5,645
MUESTRA 29	5,02
MUESTRA 30	4,881


DRA. LILIANA UYAGUARI OCAÑA
BQF. MARIA ELIZABETH CAMPOVERDE



Anexo 13. Resultados de las enzimas

FIN DE PRUEBA

5) LDH
 tiempo: 15.09.18
 velocidad: 12:47
 longitud: 340
 tiempo: 1000
 factor: 1000000
 rango: 250.0a
 lineal: 0.0a

S#	A/min	U/L	i
B	0.105		
1	-0.029	-469.8R	
2	-0.024	-390.3R	
3	-0.020	-330.5R	
4	-0.020	-334.4R	
5	-0.018	-289.1R	
6	-0.020	-326.5R	
7	-0.021	-348.2R	
8	-0.023	-300.4R	
9	-0.029	-469.8R	
10	-0.024	-387.0R	

FIN DE PRUEBA
 IMPRESORA APAGADA

FIN DE PRUEBA

5) LDH
 tiempo: 15.09.18
 velocidad: 14:17
 longitud: 340
 tiempo: 1000
 factor: 1000000
 rango: 250.0a
 lineal: 0.0a

S#	A/min	U/L	i
B	0.106		
1	-0.018	-291.7R	
2	-0.017	-275.9R	
3	-0.031	-501.3R	
4	-0.023	-367.9R	
5	-0.020	-325.2R	
6	-0.031	-509.2R	

FIN DE PRUEBA
 IMPRESORA APAGADA

StatFax 1904Plus: AAS
 17.09.18 14:57

5) LDH
 tiempo: 15.09.18
 velocidad: 14:18
 longitud: 340
 tiempo: 1000
 factor: 1000000
 rango: 250.0a
 lineal: 0.0a

S#	A/min	U/L	i
B	0.113		
1	-0.019	-304.8R	
2	-0.020	-323.9R	
3	-0.020	-324.5R	
4	-0.020	-335.1R	
5	-0.018	-296.9R	
6	-0.027	-434.9R	
7	-0.023	-379.1R	
8	-0.019	-313.4R	

FIN DE PRUEBA
 IMPRESORA APAGADA

5) LDH
 tiempo: 15.09.18
 velocidad: 15:17
 longitud: 340
 tiempo: 1000
 factor: 1000000
 rango: 250.0a
 lineal: 0.0a

S#	A/min	U/L	i
B	0.106		
1	-0.020	-328.5R	
2	-0.024	-391.6R	
3	-0.019	-310.1R	
4	-0.022	-350.7R	
5	-0.022	-364.6R	
6	-0.029	-467.8R	
7	-0.020	-322.6R	

FIN DE PRUEBA

5) LDH
 tiempo: 15.09.18
 velocidad: 15:14
 longitud: 340
 tiempo: 1000
 factor: 1000000
 rango: 250.0a
 lineal: 0.0a

S#	A/min	U/L	i
B	0.124		

FIN DE PRUEBA

5) LDH
 tiempo: 15.09.18
 velocidad: 15:17
 longitud: 340
 tiempo: 1000
 factor: 1000000
 rango: 250.0a
 lineal: 0.0a

S#	A/min	U/L	i
B	0.107		
1	-0.020	-332.4R	
2	-0.024	-307.0R	
3	-0.024	-392.2R	
4	-0.032	-515.1R	
5	-0.023	-303.0R	
6	-0.031	-503.9R	
7	-0.022	-354.1R	

FIN DE PRUEBA



10.09.19 15:47
 CINETICO/FACTOR
 LONG ONDA= 3400
 TIEMPO PREL. = 180
 Rango: 24.0a 1
 Lineal: 0.0a 1

S#	A/min	U/L	i
B	0.114		
1	0.020	163.9	C

FIN DE PRUEBA

56) CKNAC
 Revisada: 18.09.18
 CINETICO/FACTOR
 LONG ONDA= 3400
 TIEMPO PREL. = 180
 Rango: 24.0a 1
 Lineal: 0.0a 1

S#	A/min	U/L	i
B	0.278		
1	0.022	185.4	

FIN DE PRUEBA

56) CKNAC
 Revisada: 18.09.18
 CINETICO/FACTOR
 LONG ONDA= 3400
 TIEMPO PREL. = 180
 Rango: 24.0a 1
 Lineal: 0.0a 1

S#	A/min	U/L	i
B	0.115		
1	0.084	682.2A	
2	0.035	285.6A	
3	0.029	237.5A	
4	0.009	73.3	
5	0.040	330.4A	
6	0.024	196.7A	
7	0.020	168.5	
8	0.082	665.3A	

StatFax 1904Plus:AA
 19.09.18 06:44

56) CKNAC
 Revisada: 18.09.18
 CINETICO/FACTOR
 LONG ONDA= 3400
 TIEMPO PREL. = 180
 Rango: 24.0a 1
 Lineal: 0.0a 1

S#	A/min	U/L	i
B	0.119		
1	0.010	83.2	
2	0.041	337.4A	
3	0.013	105.8	
4	0.014	113.1	
5	0.011	96.2	
6	0.036	293.6A	
7	0.035	286.0A	
8	0.041	333.8A	
9	0.029	240.9A	
10	0.021	176.8	
11	0.032	260.8A	
12	0.034	276.7A	
13	0.031	252.1A	

FIN DE PRUEBA
 IMPRESORA APAGADA
 IMPRESORA PRENDIDA

55) LDH
 Revisada: 15.09.18
 CINETICO/FACTOR
 LONG ONDA= 3400
 TIEMPO PREL. = 180
 Rango: 250.0a 1
 Lineal: 0.0a 1

S#	A/min	U/L	i
B	0.117		
1	-0.023	-380.4R	
2	-0.029	-473.7R	

56) CKNAC
 Revisada: 18.09.18
 CINETICO/FACTOR
 LONG ONDA= 3400
 TIEMPO PREL. = 180
 Rango: 24.0a 1
 Lineal: 0.0a 1

S#	A/min	U/L	i
B	0.101		
1	0.010	83.6	
2	0.012	104.1	
3	0.020	163.2	
4	0.027	222.6A	
5	0.033	271.0A	
6	0.119	963.6A	
7	0.027	221.9A	
8	0.118	968.2A	
9	0.022	181.1	

FIN DE PRUEBA

56) CKNAC
 Revisada: 18.09.18
 CINETICO/FACTOR
 LONG ONDA= 3400
 TIEMPO PREL. = 180
 Rango: 24.0a 1
 Lineal: 0.0a 1

S#	A/min	U/L	i
B	0.107		
1	0.085	688.1A	
2	0.042	345.0A	
3	0.094	762.5A	
4	0.026	212.6A	
5	0.033	272.4A	
6	0.010	82.6	
7	0.040	330.4A	
8	0.023	190.4A	
9	0.033	278.7A	



55) LDH
 CINEG: 15.09.18
 LONGITUD: 18:47
 PREL: 340
 PREL: 60
 PREL: 100
 Rango: 250.0a
 Lineal: 0.0a

S#	A/min	U/L	i
8	0.109		
1	-0.032	-517.8R	
2	-0.023	-381.4R	
3	-0.030	-450.9R	
4	-0.023	-486.3R	
5	-0.020	-330.7R	
6	-0.032	-560.8R	
7	-0.031	-510.7R	
8	-0.030	-490.6R	
9	-0.019	-329.7R	
10	-0.015	-247.3R	
11	-0.027	-428.1R	

56) CKNAC
 CINEG: 18.09.18
 LONGITUD: 7:41
 PREL: 340
 PREL: 60
 PREL: 100
 Rango: 250.0a
 Lineal: 0.0a

S#	A/min	U/L	i
8	0.109		
1	-0.010	90.1R	
2	-0.040	328.6R	
3	-0.029	247.3R	
4	-0.020	158.5R	
5	-0.032	268.6R	
6	-0.084	671.6R	
7	-0.014	105.3R	
8	-0.012	95.4R	
9	-0.021	175.4R	
10	-0.029	248.3R	
11	-0.031	250.8R	
12	-0.040	228.5R	
13	-0.029	230.6R	
14	-0.039	320.8R	
15	-0.018	150.6R	
16	-0.015	118.7R	
17	-0.009	80.8R	
18	-0.033	275.9R	
19	-0.012	110.8R	
20	-0.045	380.9R	
21	-0.041	310.5R	
22	-0.041	312.8R	