

Área de Fisiología  
Dpto. de Biología Funcional  
Universidad de Oviedo

Valoración de melatonina, citrato y balance  
hídrico como indicadores de la carga de  
trabajo en el entrenamiento deportivo

**- Tesis Doctoral -**

Paula Núñez Martínez

Oviedo, 2011



“Todo pasa y todo queda,  
pero lo nuestro es pasar,  
pasar haciendo caminos,  
caminos sobre la mar.

Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.

Al andar se hace camino  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.

Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar.”

*Antonio Machado*

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la  
electricidad y la energía atómica: la voluntad.”

*Albert Einstein*



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que me han acompañado en este recorrido y, de un modo u otro, han hecho posible esta tesis:

A mis directores, por permitir que esta tesis se haga realidad. A la Dra. Beatriz Díaz López por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación y por sus inolvidables enseñanzas sobre el trabajo científico. Y al Dr. Juan Argüelles Luis por su cordialidad, colaboración y apoyo.

También a otras compañeras de investigación, a la Dra. Elena Díaz Rodríguez por sus consejos y por hacerme más fácil mi comienzo en la etapa predoctoral. Admiro su capacidad para afrontar las adversidades con una templanza y una fuerza envidiables. Y a la Dra. Carmen Perillán Méndez, por su amable disponibilidad en todo momento y su vitalidad contagiosa, por su ayuda y su confianza.

A todos los miembros del Área de Fisiología: profesores, doctorandos, contratados, técnicos de laboratorio, laborante... los que han estado y los que están, por lo que he aprendido de cada uno de ellos. Gracias por las muestras de simpatía y de buen compañerismo que he recibido en este tiempo, y que recordaré siempre.

Al personal de secretaría del Departamento de Biología Funcional. A Pilar Cuesta y a Ana Isabel Pérez por su ayuda con todo el entramado burocrático que conlleva una tesis desde sus inicios.

A los componentes del Equipo Autonómico de Natación del Principado de Asturias (Polideportivo de El Cristo, Oviedo) y de la Selección Española Junior y Senior B de Piragüismo (Centro de Tecnificación Deportiva de Trasona, Corvera de Asturias) que han participado en este estudio. Así como al Dr. Nicolás Terrados, jefe de la Unidad Regional de



Medicina Deportiva del Principado de Asturias, y al entrenador del Equipo Autonómico de Natación, Jerónimo Sánchez Bas.

A los trabajadores del Bioterio de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo por su amabilidad. Al Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Central de Asturias, por permitirme utilizar el equipo técnico necesario para la determinación de citrato urinario. A la Dra. Ana Suárez del Área de Inmunología por dejarnos usar su lector de placas y al Dr. Jorge Tolivia del Área de Biología Celular por cedernos su microscopio óptico para el estudio de los cortes cerebrales.

A Cristina y Yaiza por su valiosa amistad. A Rebeca, por animarme en su día a intentar unirme a un grupo de investigación, lo que fue el primer paso para llegar hasta aquí.

De manera muy especial y con todo mi cariño, a mis abuelos, Edelmira y José Luis, a mis padres, Clara y Julián, y a mi hermano "Tito". Por su comprensión, por darme siempre su enorme e infinito apoyo, por sus consejos, por aguantar mis agobios, por animarme y consolarme siempre que lo he necesitado. Esta tesis, ¡va por vosotros! Un billón de gracias.

A todos los que se han interesado y me han dado ánimos en esta labor.

Esta tesis ha sido realizada gracias a la financiación del Consejo Superior de Deportes (CSD) al proyecto titulado "Valoración de citrato y melatonina en deportistas de alto rendimiento" (08/UPB 10/05), y de la Universidad de Oviedo al proyecto "Modelos que permiten cuantificar la carga fisiológica del entrenamiento deportivo de forma no invasiva" (UNOV-08-MA-108). Investigador Principal de ambos proyectos: Beatriz Díaz López.





## **LISTA DE ABREVIATURAS**

5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HTP	5-hidroxitriptófano
AAAD	L-aminoácido aromático descarboxilasa
Acetil CoA	Acetil coenzima
ACTH	Hormona adenocortitropa
ATP	Adenosín trifosfato
AV3V	Región anteroventral del tercer ventrículo
AVP	Hormona vasopresina
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CS	Enzima citrato sintasa
CVOs	Órganos circunventriculares
DTNB	Ácido dinitrobenzoico
E	Adrenalina
ECA	Enzima de conversión de la angiotensina
FC	Frecuencia cardiaca
GCS	Ganglio cervical superior
GCSx	Ganglionectomía cervical superior
HIOMT	Enzima hidroxindol-O-metiltransferasa
ICAC	Intermediarios del ciclo del ácido cítrico
JM	Jaula metabólica
Na <sup>+</sup>	Ion sodio
NE	Noradrenalina
OAA	Ácido oxalacético
OT	Oxitocina
PC	Fosfocreatina
PFK	Fosfofructoquinasa
PVN	Núcleo paraventricular
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SFO	Órgano subfornical
S-NAT	Enzima serotonin-N-acetiltransferasa
SNC	Sistema nervioso central
SON	Núcleo supraóptico
SQ	Núcleo supraquiasmático
TH	Enzima triptófano hidroxilasa
VO <sub>2</sub>	Volumen máximo de oxígeno
<sup>α</sup> MT6S	6-sulfatoximelatonina



# **ÍNDICE**

## **INTRODUCCIÓN**

<b>1.1.- El Entrenamiento Físico .....</b>	<b>3</b>
1.1.1.- Principios básicos del entrenamiento .....	3
<b>1.2.- Metabolismo Energético en el Ejercicio.....</b>	<b>6</b>
1.2.1.- Tipos de vías metabólicas.....	6
1.2.2.- Utilización de las vías metabólicas en el ejercicio.....	7
1.2.3.- Músculo y ejercicio.....	9
<b>1.3.- La Melatonina.....</b>	<b>11</b>
1.3.1.- La glándula pineal y el control nervioso de la síntesis de melatonina.....	11
1.3.2.- La síntesis de melatonina .....	12
1.3.3.- El control circadiano (luz/oscuridad) de la síntesis de melatonina .....	14
1.3.4.- Melatonina y catecolaminas .....	15
1.3.5.- Melatonina y ejercicio físico.....	16
<b>1.4.- El Citrato.....</b>	<b>21</b>
1.4.1.- Implicaciones del citrato en la formación de energía.....	21
1.4.2.- Intermediarios del ácido cítrico .....	22
1.4.3.- Metabolismo del ácido cítrico.....	23
1.4.4.- Citrato sintasa y ejercicio físico .....	23
<b>1.5.- El Balance Hídrico .....</b>	<b>28</b>
1.5.1.- Regulación del balance hídrico.....	28
1.5.2.- El sistema hipotálamo-hipofisario.....	30
1.5.3.- Centros reguladores de la vasopresina u hormona antidiurética.....	33
1.5.4.- Centros reguladores del sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	35
1.5.5.- Balance hídrico y ejercicio físico .....	37

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

<b>2.1.Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>41</b>
---------------------------------------	-----------

## **SUJETOS Y MÉTODOS**

<b>3.1.- Estudio en Humanos.....</b>	<b>47</b>
3.1.1.- Sujetos de Estudio .....	47
3.1.2.- Características del Estudio .....	48
3.1.3.- Recogida de muestras de orina.....	51
3.1.4.- Determinación de citrato en orina.....	51
3.1.5.- Determinación de 6-sulfatoximelatonina en orina .....	55
3.1.6.- Análisis estadísticos.....	60
<b>3.2.- Experimentación en un modelo animal.....</b>	<b>61</b>
3.2.1.- Protocolo de ejercicio.....	62
3.2.2.- Recogida de muestras .....	63
3.2.3.- Determinación de hematocrito, proteínas totales y osmolaridad .....	65
3.2.4.- Aislamiento mitocondrial .....	66
3.2.5.- Determinación de la actividad citrato sintasa.....	70
3.2.6.- Determinación de la actividad neuronal.....	74
3.2.7.- Análisis estadístico .....	77

## **RESULTADOS**

<b>4.1.- Resultados en deportistas .....</b>	<b>81</b>
4.1.1.- Cuantificación de 6-sulfatoximelatonina en nadadores .....	81
4.1.2.- Cuantificación de 6-sulfatoximelatonina en piragüistas.....	82
4.1.3.- Cuantificación de citrato urinario en nadadores .....	87
4.1.4.- Cuantificación de citrato urinario en piragüistas.....	88
4.2.5.- Razón (mañana/noche) de 6-sulfatoximelatonina y citrato .....	93
<b>4.2.- Resultados en el modelo animal .....</b>	<b>94</b>
4.2.1.- Estudio del peso y la ingesta en el modelo animal .....	94
4.2.2.- Cuantificación de citrato urinario .....	97
4.2.3.- Membrana mitocondrial intacta .....	99
4.2.4.- Actividad citrato sintasa .....	100
4.2.5.- Balance hídrico: determinaciones plasmáticas y urinarias.....	102
4.2.6.- Actividad neuronal .....	108

## **DISCUSIÓN**

<b>5.1.-Melatonina en deportistas .....</b>	<b>117</b>
5.1.1.- Nadadores .....	117
5.1.2.- Piragüistas .....	119
<b>5.2.- Citrato urinario en deportistas .....</b>	<b>121</b>
5.2.1.- Nadadores .....	121
5.2.2.- Piragüistas .....	122
<b>5.3.- Razón mañana/noche de 6- sulfatoximelatonina y citrato en deportistas ..</b>	<b>124</b>
<b>5.4.- Citrato en el modelo animal .....</b>	<b>126</b>
5.4.1.- Citrato urinario .....	126
5.4.2.- Actividad citrato sintasa .....	127
<b>5.5.- Balance hídrico en el modelo animal .....</b>	<b>132</b>
5.5.1.- Determinaciones plasmáticas y urinarias .....	132
5.5.2.- Actividad neuronal .....	134
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147</b>



## **INTRODUCCIÓN**





## **1.1.- El Entrenamiento Físico**

El tipo de ejercicio físico clasificado como entrenamiento físico se define como la serie de actividades físicas realizadas de una manera continua con el objeto de mejorar la eficiencia física, para lo cual ha de ser sistemático, regular y progresivo. Desde el punto de vista fisiológico, el desarrollo de las distintas capacidades físicas se basa en un proceso de permanente adaptación a las cargas de trabajo (estímulos de ejercitación física) (Caspersen y cols., 1985).

Entre los objetivos a conseguir en el entrenamiento físico, presenta gran interés el conocimiento de la respuesta del cuerpo a lo largo del tiempo ante la tensión de series repetidas de ejercicios. Cuando se realizan ejercicios regulares durante un número determinado de semanas, el cuerpo se adapta. Las adaptaciones fisiológicas que se producen con la exposición crónica al ejercicio, mejoran tanto la capacidad como la eficiencia en el ejercicio, y son específicas del tipo de entrenamiento que se siga. Por ejemplo, con el entrenamiento contra resistencia los músculos se fortalecen, con el entrenamiento aeróbico el corazón y los pulmones ganan eficiencia y la capacidad de resistencia se ve mejorada (Wilmore y Costill, 2001).

### **1.1.1.- Principios básicos del entrenamiento**

El tiempo necesario para que se produzca una respuesta o adaptación es variable según la naturaleza, duración, volumen e intensidad de los estímulos aplicados, y es diferente en los distintos individuos. Igualmente el periodo de tiempo durante el cual puede mejorar la eficiencia funcional, así como el perfeccionamiento de capacidades, posee una gran variabilidad interindividual; en definitiva la eficiencia funcional está en relación con múltiples factores como son las condiciones innatas, la edad o el grado de entrenamiento físico (Villa y cols., 1996). Entre los principios a tener en cuenta están:

**Principio de individualidad.** La forma física, también denominada condición física o aptitud física, implica el funcionamiento óptimo de todos los sistemas funcionales del organismo, es decir, la eficiencia óptima del organismo que hace posible desarrollar el mayor potencial fisiológico del propio individuo. No existe una aptitud física universal. La diferencia de aptitud física interindividual o intraindividual (evolución de la misma en un sujeto), depende de muchos factores, ya sean constitutivos (genéticos, edad, sexo), ligados al entorno o ambiente (entrenamiento, nutrición) o al propio envejecimiento o involución biológica (Monod y Garcin, 1996). La aptitud significa la relación entre la tarea que se ha de realizar y la capacidad del individuo para realizarla (Morehouse, 1968).

**Principio de especificidad.** El programa de entrenamiento debe reforzar los sistemas fisiológicos que son críticos para que haya un rendimiento óptimo en cada deporte. Para ello deben utilizarse estímulos de una naturaleza, volumen e intensidad determinados, a fin de lograr adaptaciones de entrenamiento específicas que den lugar a un incremento del rendimiento. Se define al volumen como el aspecto cuantitativo de la carga, y la intensidad como el volumen de la carga en función del tiempo, así por ejemplo, en nadadores el volumen sería la distancia o espacio recorrido, y la intensidad sería los metros recorridos por segundo.

**Principio de sobrecarga progresiva.** El principio de sobrecarga señala que en el entrenamiento las cargas del trabajo deben aumentar gradualmente en el tiempo a medida que mejora la forma del deportista. Si éstas no varían durante un largo periodo de tiempo, se perderá la capacidad de entrenamiento, descendiendo el rendimiento. Pero es necesario un tiempo de recuperación después de una carga eficaz, para poder soportar en condiciones favorables una carga similar en la siguiente sesión de entrenamiento. Si se aplican cargas sin haber completado la fase de recuperación se producirá sobreentrenamiento, manifestado como una forma de agotamiento crónico y sistemático, más allá de la simple fatiga. El principio de sobrecarga es un componente importante del entrenamiento deportivo y proporciona estímulos óptimos para la adaptación. En etapas tempranas, el sobreentrenamiento se refleja sólo por una fatiga aumentada y un rendimiento disminuido, pero con la acumulación

de la fatiga aparecen otros síntomas objetivos (disminución de la fuerza de contracción muscular, lesiones articulares y musculares, aumento de la frecuencia cardíaca en reposo y ejercicio...) y subjetivos (sensación de agotamiento y cansancio, sensación de depresión...) (Córdova, 1997). El síndrome de sobreentrenamiento presenta una disfunción completa del sistema neuroendocrino de origen básicamente hipotalámico, cuyo mecanismo fisiopatológico es aún poco conocido. En la actualidad no hay ninguna prueba específica para prevenir y diagnosticar el sobreentrenamiento (Marín y cols., 1996; Halson y Jeukendrup, 2004).

## 1.2.- Metabolismo Energético en el Ejercicio

Para realizar cualquier actividad física, intelectual o sensorial, incluso en reposo, se necesita una aportación energética. Ese aporte sólo se puede obtener de la molécula denominada ATP (adenosín trifosfato), "transportadora" universal de energía de nuestro cuerpo, que el organismo produce en las mitocondrias durante la respiración celular. Esta sustancia presente en la célula se "desgasta" y se vuelve a "recargar". Cuando la molécula de ATP se hidroliza, la alta carga energética acumulada en ella se libera y es utilizada por el organismo para todas las acciones que la precisen.

### 1.2.1.- Tipos de vías metabólicas

**Primera vía: Anaeróbica aláctica.** La forma más rápida de resintetizar ATP es utilizando la fosfocreatina (PC), la cual se encuentra en la célula y posee un grupo fosfato cuyo enlace es portador de energía. Las reservas de PC en el músculo son bajas y se agotan muy pronto, duran menos de 30 segundos, al final de un sprint de 100 metros ya se han agotado. En esta vía no interviene el oxígeno, por lo tanto es una vía anaeróbica (García y cols., 1997).

**Segunda vía: Anaeróbica láctica.** Es la glucólisis anaerobia o sistema del ácido láctico. En este sistema se van a descomponer hidratos de carbono o azúcares (glucógeno) para dar la energía requerida para la síntesis del ATP. El proceso en el que se forma ácido láctico tiene lugar en ausencia de oxígeno y puede aportar energía para una actividad muscular máxima de hasta 90 segundos. La acidosis provocada por la acumulación de ácido láctico, compromete la actividad funcional normal de la maquinaria contráctil, los iones  $H^+$  dificultan la interacción troponina/calcio, lo que lleva rápidamente a la aparición de fatiga (Terrados, 1992).

**Tercera vía: Aeróbica.** El ATP se resintetiza a partir de la degradación del glucógeno y principalmente de las grasas. Esta vía requiere de la presencia de oxígeno, y las reacciones químicas que producen ATP se efectúan a través de tres sistemas metabólicos que son: la glucólisis, el Ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico) y la cadena respiratoria (o sistema de transporte electrónico). Al estar implicadas todas estas

rutas, la obtención de ATP será más lenta que en las vías anteriormente citadas, pero también la hacen más eficaz. No produce desechos limitantes, se libera CO<sub>2</sub>, que se elimina por la respiración, y H<sub>2</sub>O, conocida como agua metabólica, que es aprovechada por la propia célula o es expulsada por el sudor y la orina (De Feo y cols., 2003).

### 1.2.2.- Utilización de las vías metabólicas en el ejercicio

Bompa (1999) relacionó un sistema de índices o zonas de intensidad con la fuente energética empleada, los niveles del lactato, la frecuencia cardiaca (FC) y la participación de los metabolismos aeróbico y anaeróbico durante el ejercicio (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de intensidad del ejercicio y parámetros relacionados

ZONA	DURACIÓN	INTENSIDAD	FUENTE ENERGÉTICA	LACTATO (mmol/l)	FC (pulsaciones/min)	% ANAERÓBICA/AERÓBICA
1	15" - 60"	máxima	ATP / PC + láctica	>12	máxima	90 - 80 / 10 - 20
2	1' - 6'	submáx.	láctica + O <sub>2</sub>	6 a 12	180	30 - 70 / 70 - 30
3	6' - 30'	media	aeróbico intensivo	4 a 6	100 a 160	10 - 40 / 90 - 60
4	1" - 15"	límite	ATP - PC	---	---	100 - 95 / 0 - 5
5	> 30'	débil	aeróbico extensivo	2 a 4	130 a 150	0 - 5 / 100 - 95

Al empezar a realizar el ejercicio, las tres vías metabólicas anteriormente citadas, funcionan a la vez (Figura 1), y conforme va pasando el tiempo y dependiendo de la intensidad, se van agotando las reservas. Según cuál de las vías predomine hablaremos de deportes aeróbicos o anaeróbicos. Todos los sistemas de entrenamiento están dirigidos a un aprovechamiento más eficaz de los distintos elementos utilizados para sintetizar de nuevo ATP, retrasando así la aparición de la fatiga, que puede ocurrir por agotamiento de reservas o bien por el acúmulo de desechos limitantes, como por ejemplo el lactato (Arratibel y Córdova, 1997).

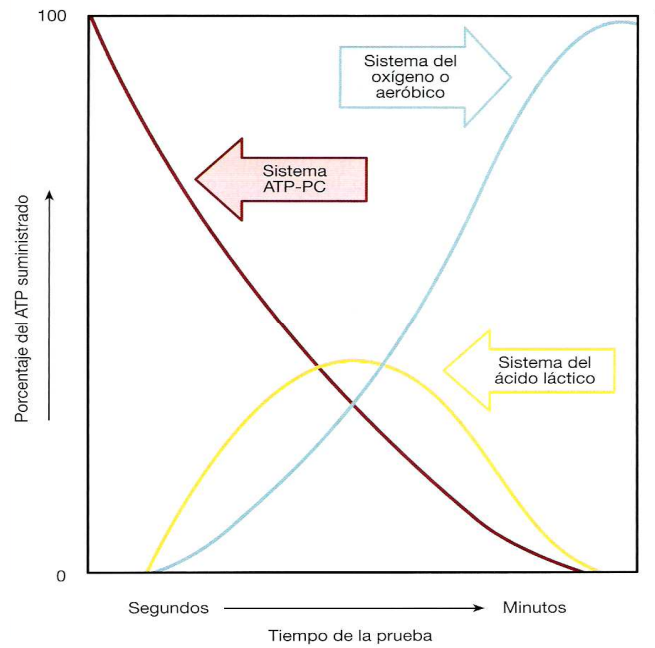


Figura 1. Variación de las fuentes energéticas (vías metabólicas) con la duración del ejercicio.

Una de las finalidades de los programas de entrenamiento es producir adaptaciones metabólicas que permitan que los deportistas mejoren su rendimiento. Para ello, a la hora de planificar el entrenamiento se debe tener en cuenta la relación entre los sistemas energéticos y las cualidades motoras asociadas al mismo (Tabla 2) (Costill y cols., 2001).

Tabla 2. Relación entre los sistemas energéticos y las cualidades motoras

FACTORES A CONSIDERAR	ANAERÓBICO ALÁCTICO	ANAERÓBICO LÁCTICO	AERÓBICO
<b>INTENSIDAD</b>	MÁXIMA	MÁXIMA - SUBMÁXIMA	SUBMÁXIMA - MEDIA BAJA
<b>DURACIÓN</b>	4" a 6" / 8"	40" – 60"	5' - 15'
<b>POTENCIA</b>	Hasta 20"	Hasta 120"	Hasta 2 - 3 horas
<b>CAPACIDAD</b>	Velocidad, Fuerza máxima, Potencia anaeróbica	Resistencia a la velocidad, Resistencia anaeróbica	Resistencia aeróbica, Resistencia muscular
<b>CUALIDADES MOTORAS ASOCIADAS</b>	Actividades intensas y breves	Actividades intensas de duración media	Actividades de baja-media intensidad y duración larga
<b>UTILIZACIÓN DE</b>	ATP/PC	GLUCÓLISIS	OXIDATIVO
<b>OBSERVACIÓN</b>			

### **1.2.3.- Músculo y ejercicio**

El combustible necesario para mantener una correcta homeostasia es el resultado de un conjunto de sucesos relacionados con la acción hormonal y con el suministro de sustratos. La interacción de las vías metabólicas de los carbohidratos, las grasas y los aminoácidos proporciona el sustrato necesario para el metabolismo energético muscular (Wasserman y Cherrington, 1991). Durante el ejercicio prolongado ambos, glucosa y ácidos grasos libres son utilizados como combustibles. A pesar de que la depleción de glucógeno puede proporcionar la mayoría de los carbohidratos necesarios para realizar actividades de resistencia, la mayor contribución es la de la glucosa hepática obtenida por gluconeogénesis y glucogenólisis. La habilidad para almacenar y mantener el glucógeno hepático, se ha considerado el factor limitante para la realización eficaz de las actividades de resistencia submáxima (Hagerman, 1992; Henriksson, 1995; Kimber y cols., 2003).

No todas las fibras musculares son iguales. Un mismo músculo esquelético contiene dos tipos principales de fibras, fibras tipo I y fibras tipo II (Tabla 3). Las fibras tipo I, son fibras muy vascularizadas, que poseen numerosas mitocondrias y una concentración elevada de mioglobina, un pigmento que facilita el aporte de oxígeno a las mismas y les da un aspecto rojizo. Tienen una alta capacidad oxidativa y elevada resistencia a la fatiga. Las fibras tipo II, son fibras de contracción rápida, son más gruesas y tienen menos mitocondrias que las de contracción lenta, poseen una gran reserva de glucógeno con concentraciones elevadas de enzimas glucolíticos, están mejor adaptadas para rendir anaeróbicamente y presentan una baja resistencia a la fatiga. Las fibras tipo II se pueden clasificar en dos subtipos: Fibras tipo IIA y Fibras tipo IIB. Las fibras tipo IIA o fibras oxidativas rápidas, están menos vascularizadas que las fibras tipo I y poseen más miosina que estas. Las fibras de tipo IIB son requeridas en actividades o ejercicios muy intensos y rápidos, posee más miosina y menos vascularización que las de tipo IIA (Fox, 2008).

Tabla 3. Características de las fibras musculares esqueléticas

CARACTERÍSTICAS	FIBRA TIPO I	FIBRA TIPO IIA	FIBRA TIPO IIB
CAPILARIZACIÓN	Alta	Alta	Baja
CANTIDAD DE MITOCONDRIAS	Alta	Alta	Baja
VELOCIDAD CONTRÁCTIL	Lenta	Rápida	Rápida
RESISTENCIA A LA FATIGA	Alta	Moderada	Baja
CAPACIDAD AERÓBICA (OXIDATIVA)	Alta	Moderada	Baja
CAPACIDAD ANAERÓBICA (GLUCOLÍTICA)	Baja	Alta	Alta

Los porcentajes de las distintas fibras no son los mismos en todos los músculos del cuerpo. El gastrocnemio (gemelo) actúa en las articulaciones de la rodilla y del tobillo. La elevación del talón durante la marcha, el lanzamiento del cuerpo al aire en la carrera y en los saltos, y todos los movimientos contrarios a la dorsiflexión son funciones de este músculo que depende de la potencia, justificando el porcentaje mayor de fibras rápidas o tipo II. El sóleo es un músculo más ancho y plano que sirve, de base para los movimientos de los gastrocnemios, encontrándose exactamente por debajo de él. Su acción es postural, se encarga de la inversión del pie estabilizando la pierna sobre este, y como su acción es más duradera, presenta mayor porcentaje de fibras del tipo I (McArdle, 2004).



### 1.3.- La Melatonina

#### 1.3.1.- La glándula pineal y el control nervioso de la síntesis de melatonina

La glándula pineal tiene una estructura de pequeño tamaño y forma cónica, es una excrecencia del techo del diencefalo en la pared posterior del tercer ventrículo, está situada entre los tálamos ópticos por debajo del cuerpo calloso, del que la separa la tela coroidea superior, y se apoya sobre el espacio que dejan entre sí los tubérculos cuadrigéminos anteriores de la superficie dorsal del mesencéfalo (lecho de la glándula pineal) (Pérez-Casas y Bengoechea, 1967). La hormona principal de la glándula pineal es la melatonina (Figura 2). El término melatonina fue acuñado por primera vez por Lerner y colaboradores tras su descubrimiento en el año 1959.

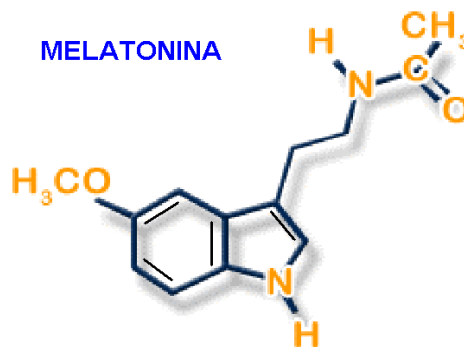


Figura 2. Estructura molecular de la melatonina.

La actividad de la glándula pineal y la correspondiente síntesis de melatonina están reguladas por la luz ambiental, siguiendo una ruta nerviosa, que comienza en la retina, donde es recibida la señal luminosa (Figura 3), la cual es transmitida, a través del tracto retino-hipotalámico, hacia el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (SQ) (Moore, 1978). Del núcleo SQ (Figura 4) se proyectan conexiones nerviosas al núcleo paraventricular (PVN) y al área tuberal ventral del hipotálamo (Swanson y Cowan, 1975), que conectan en el interior del núcleo lateral hipotalámico con neuronas que descienden por el tallo cerebral y comunican directamente con la columna de células intermediolateral del cordón torácico superior (Sapper y cols., 1976), de donde surgen

fibras pregangliónicas simpáticas que abandonan el sistema nervioso central por la parte ventral hasta llegar al ganglio cervical superior (GCS) de la cadena simpática, del que parten fibras postsinápticas postgangliónicas que alcanzan la glándula pineal. Desde estas terminales, durante la fase oscura del fotoperiodo, se libera noradrenalina (NE), que al actuar sobre receptores  $\beta$ -adrenérgicos de las células parenquimáticas pineales (pinealocitos) (Axelrod y cols., 1969), estimula la maquinaria biosintética de la melatonina. En la glándula pineal también pueden existir otras inervaciones probablemente peptidérgicas, gabaérgicas, glutaérgicas y colinérgicas (Cardinali y cols., 1987).

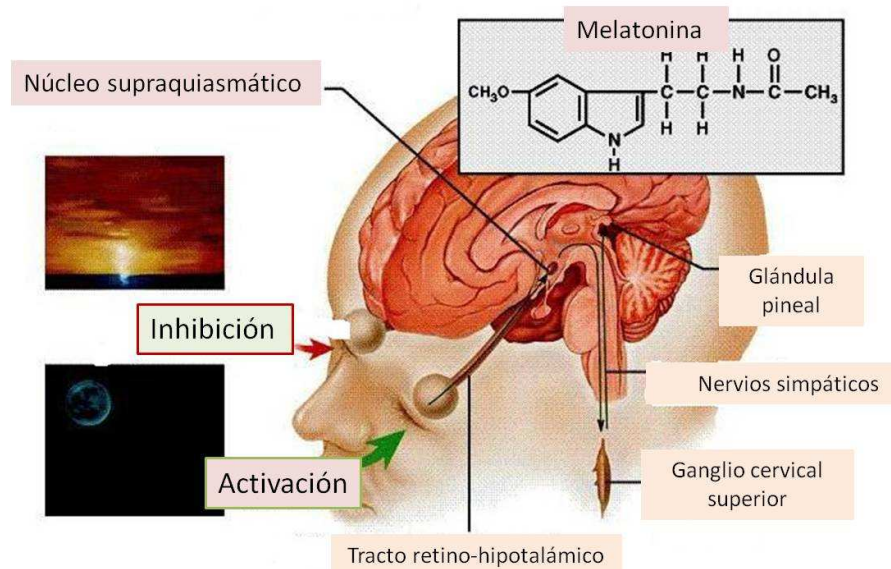


Figura 3. Control nervioso de la síntesis de melatonina (modificado de Guyton y Hall, 2007).

### 1.3.2.- La síntesis de melatonina

La formación de melatonina (Figura 4) tiene lugar en los pinealocitos de la siguiente manera:

El primer paso depende del aminoácido triptófano, y es catalizado por la enzima triptófano hidroxilasa (TH) que da origen a 5-hidroxitriptófano (5-HTP), el cual es después descarboxilado a serotonina por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD). Una parte de la serotonina será después N-acetilada por la

enzima serotonín-N-acetiltransferasa (S-NAT) para formar N-acetilserotonina. Posteriormente, la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), altamente concentrada en la glándula pineal de todas las especies de vertebrados examinadas, transfiere un grupo metilo desde S-adenosil-metionina al grupo hidroxilo de la posición 5 de la N-acetilserotonina, convirtiéndola en melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Axelrod y Weissbach, 1961).

La enzima S-NAT es una enzima crítica en la síntesis de melatonina, su actividad aumenta al poco tiempo de comenzar la oscuridad (Klein y Weller, 1970) a causa de la liberación aumentada de NE (Axelrod y cols., 1969).

Una vez que es sintetizada la melatonina en la glándula pineal, es liberada a la circulación sanguínea, donde se une a la albúmina (Cardinali y cols., 1972). La mayor parte de la melatonina circulante es metabolizada en el hígado donde experimenta dos reacciones. Primero una oxidación por el citocromo p450 originando 6-hidroximelatonina, seguida de una conjugación con el enzima sulfotransferasa dando origen al catabolito 6-hidroximelatonina sulfato, denominado 6-sulfatoximelatonina ( $\alpha$ MT6S), que se elimina en la orina, siendo sólo una pequeña porción de melatonina eliminada de forma libre (Kopin y cols., 1961; Wilkinson y cols., 1977; Leoe y Silman, 1984).

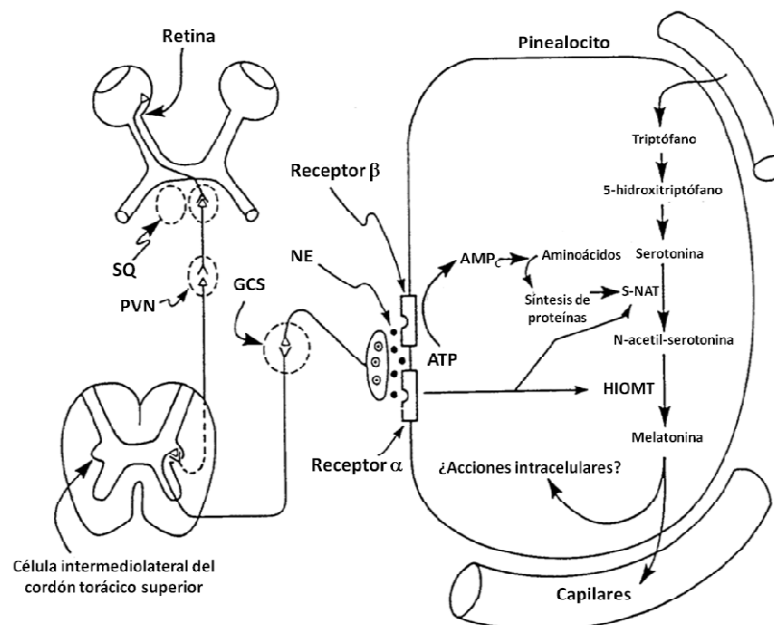


Figura 4. Biosíntesis de la melatonina (modificado de Reiter, 1993).

La 6-sulfatoximetatonina ( $\alpha$ MT6S), es el metabolito de la melatonina más abundante en orina (55-80%), además hay estudios que demuestran la correlación entre la excreción urinaria de  $\alpha$ MT6S y la melatonina circulante en plasma (Arendt y cols., 1985; Markey y cols., 1985; Bojkowski y cols., 1987; Bojkowski y Arendt, 1988; Graham y cols., 1998; Cook y cols., 2000) o en suero (Nowak y cols., 1987; Bruce y cols., 1991; Kovács y cols., 2000;). Siendo por tanto un buen indicador de la función pineal mediante técnicas no invasivas (Middleton, 2006; Pääkkönen y cols., 2006).

### 1.3.3.- El control circadiano (luz/oscuridad) de la síntesis de melatonina

El factor más importante en la producción de melatonina pineal es la alternancia diaria luz/oscuridad. La síntesis de melatonina en la glándula pineal se produce de manera circadiana y no se almacena, se libera una vez sintetizada, lo que hace que los niveles de melatonina varíen con el periodo circadiano, siendo más altos en la noche que durante el día en todos los organismos estudiados, independientemente de sus patrones de actividad-reposo (Reiter, 1993). En personas sanas la concentración plasmática de melatonina comienza a aumentar hasta valores detectables (generalmente de 5 pg/mL) durante la tarde, alcanzando niveles máximos en mitad de la noche que pueden ser hasta 30 veces más altos que los valores diurnos y que van decreciendo gradualmente hasta la mañana (Atkinson y cols., 2003). En condiciones normales de iluminación diurna, este patrón de secreción es muy estable y la melatonina nocturna se considera un marcador fiable del estado correcto de la regulación endógena (Macchi y Bruce, 2004).

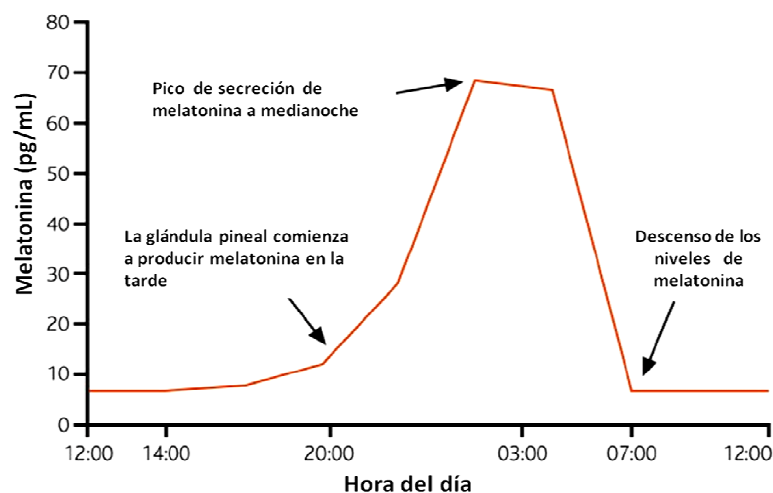


Figura 5. Patrón circadiano de secreción de la melatonina (Modificada de Arendt, 1988).

#### **1.3.4.- Melatonina y catecolaminas**

El papel de las catecolaminas adrenales, en la regulación de la síntesis de melatonina, se consideró de gran interés, dado que la síntesis de la misma está regulada por la NE liberada desde las terminales nerviosas simpáticas dentro del parénquima pineal (Axelrod y cols., 1969). Por lo cual se razonó, que una liberación de catecolaminas aumentada desde las glándulas adrenales durante una situación de estrés, podría alterar la producción de melatonina pineal. Con dicha base, se realizaron diversos estudios que implicaban parámetros de estrés, para determinar el papel de las catecolaminas extrapineales sobre la síntesis de melatonina pineal.

Aunque la luz ambiental es el principal factor que controla la corriente de impulsos nerviosos simpáticos a la glándula pineal, se observó que cualquier manipulación que cause una activación mayor del sistema nervioso simpático (Lynch y cols., 1975), puede superar el efecto inhibitor de la luz y estimular la síntesis de melatonina pineal. Por ejemplo, si se mantiene a animales bajo luz continua, pero se les somete a estrés de inmovilización por 2 horas, o se les vuelve hipoglucémicos por un periodo similar, se observó un aumento de secreción de adrenalina (E) y del enzima S-NAT, que participan en la síntesis de melatonina (Lynch y cols., 1973, 1975). Cuando la glándula pineal es denervada (Champney y cols., 1985), estas respuestas al estrés no disminuyen, sino que son potenciadas, sin embargo son suprimidas cuando se extirpan las glándulas adrenales (Tannenbaun y cols., 1987). En contraste, la síntesis aumentada de melatonina que tiene lugar tras el comienzo de la oscuridad es suprimida experimentalmente por denervación de la glándula pineal, pero no se ve afectada por la adrenalectomía bilateral (Lynch y cols., 1977). Estas observaciones son compatibles con la hipótesis de que la melatonina puede ser una hormona indicadora del estrés, como es la hormona adenocortitropa (ACTH), la prolactina y la vasopresina (AVP).

Champney y colaboradores en 1985, estudiaron el papel de las catecolaminas adrenales en la regulación de la síntesis de melatonina, sometiendo a animales de experimentación a estrés hipoglucémico propiciado por la inyección de 5 ó 10 unidades internacionales (IU) de insulina. Los resultados mostraron que en la rata macho los niveles de E y NE en plasma aumentaron, mientras que los niveles adrenales de NE se vieron inalterados y los de E disminuidos. Sus efectos sobre la pineal se

tradujeron en una mayor cantidad de la enzima S-NAT y del contenido de melatonina, 2 ó 3 horas tras la inyección aguda de insulina.

Los autores concluyen que la síntesis de melatonina en la glándula pineal de rata responde al estrés, con una respuesta mediada por la inervación simpática, utilizando los siguientes mecanismos: dado que la ganglionectomía cervical superior (GCSx), la cual destruye la mayoría de las terminaciones de fibras postgangliónicas dentro de la glándula pineal, potenció la respuesta al estrés, esto indica que las terminaciones nerviosas simpáticas ejercen un papel protector, captando cualquier exceso de catecolaminas desde el espacio extracelular, el cual se perdería tras la GCSx, y por ello se podrían observar grandes subidas de la actividad S-NAT. Otro mecanismo para explicar la respuesta aumentada de la actividad S-NAT al estrés, es el desarrollo de mayor sensibilidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos después de la GCSx, de tratamiento farmacológico (insulina), o de exposición a luz constante (Champney y cols., 1985).

Estudios más recientes (Pertsov y cols., 2004) en neuronas del hipotálamo lateral de ratas Fisher-344, ponen de manifiesto la acción protectora de la melatonina ante el estrés emocional, produciendo una supresión de la excitabilidad de las neuronas y cambios en su sensibilidad a la NE. Otros trabajos demostraron como la activación de corta duración del sistema simpático-adrenal, inducida por la inyección intramuscular de NE, se acompañó de niveles plasmáticos elevados de melatonina, y como la misma activación pero aplicada por un periodo mayor de tiempo, desencadenó la atrofia del parénquima pineal, seguida por un descenso de la síntesis de melatonina (Tavartkiladze y cols., 2006).

### **1.3.5.- Melatonina y ejercicio físico**

La glándula pineal es un órgano diana del sistema nervioso simpático, y el estrés puede aumentar la síntesis de la hormona melatonina según se describe en el apartado anterior. El ejercicio físico es considerado como un tipo de estrés que conlleva una sucesión de estímulos, de tal magnitud que tienden a desorganizar la homeostasis del organismo. La influencia del ejercicio físico sobre la actividad de la glándula pineal ha sido investigada por diferentes autores y bajo diferentes protocolos.

- **Estudios en animales**

Con el fin de investigar el efecto ocasionado por un estímulo como es la natación, sobre la actividad de la glándula pineal, Troiani y cols. (1988b), determinaron el comportamiento de las enzimas implicadas en la síntesis de melatonina y de dos precursores de la misma, 5-hidroxitriptamina (5-HT) y 5-HTP, en ratas sometidas a un ejercicio de natación durante 10 minutos a las 23:10 horas (oscuridad a las 20:00 horas). Las enzimas estudiadas S-NAT e HIOMT no modificaron sus actividades con relación al grupo control tras 15 ó 30 minutos después de iniciar el ejercicio de natación. Sin embargo, el contenido de melatonina pineal descendió dramáticamente en ambos tiempos y el nivel medio de melatonina en suero subió a los 15 minutos, pero sin mostrar diferencias significativas. Los precursores 5-HT y 5-HTP no se vieron modificados por el efecto de la natación. Los autores concluyen, que la natación aumenta la tasa de liberación de melatonina desde la glándula pineal, dado que ni las actividades enzimáticas, ni los contenidos de los precursores, se ven modificados.

Con el fin de averiguar la influencia de las catecolaminas liberadas desde las terminales nerviosas simpáticas, en la reducción dramática de la síntesis de melatonina en la glándula pineal de la rata, tras la realización de ejercicio físico, Troiani y cols. (1988a), estudiaron la influencia del sistema nervioso simpático sobre la actividad de dicha glándula. Para ello utilizaron ratas macho, sometidas a ejercicio de natación durante 10 minutos, a las 23:10 horas, lo cual desencadenó una importante subida en la circulación de catecolaminas, NE y E. Igualmente, descendió notablemente el contenido de melatonina pineal, pero la actividad S-NAT de nuevo permaneció inalterada. La reducción de los niveles de melatonina pineal inducidos por la natación no se vieron influidos ni por hipofisectomía, ni por GCSx, ni por la reserpina, agente que elimina la NE de las vesículas postsinápticas postgangliónicas. Con lo cual concluyen, que las catecolaminas liberadas desde las terminales nerviosas simpáticas no son las desencadenantes de la reducción drástica de los niveles de melatonina en la pineal de la rata. Si bien, las catecolaminas que derivan de la estimulación de las glándulas adrenales participan en la respuesta de la glándula pineal al ejercicio físico, el mecanismo por el cual se produce un descenso del contenido de melatonina en glándula pineal, permanece sin resolver.

Finalmente, al comparar dos situaciones estresantes, la natación o la inyección salina practicada a una rata, se observó que cuando las ratas fueron adrenalectomizadas, esta operación quirúrgica evitó la caída de la actividad S-NAT y del contenido de melatonina en pineal causado por el estrés de la inyección salina. Pero este procedimiento quirúrgico no previene el descenso en el contenido de melatonina en glándula pineal, observado tras la natación realizada durante 10 minutos a las 23:10 horas, lo cual indica, que los mecanismos responsables de los cambios observados son diferentes para estos dos estresantes (Joshi y cols., 1986).

Teniendo en cuenta que el ión calcio tiene un papel fundamental en la liberación de hormonas hipofisarias, y que un mecanismo similar podría estar implicado en la liberación de melatonina desde la glándula pineal, Morton y cols., (1989) examinaron los efectos de los bloqueantes de la entrada del ión calcio sobre la liberación de melatonina, o su contenido en pineal en ratas forzadas a nadar. El descenso del contenido de melatonina en pineal tras la natación fue prevenido por los antagonistas del calcio, verapamil y nifedipina. Ninguno de los antagonistas del calcio tuvo efecto sobre la enzima S-NAT o sobre el contenido de melatonina en los grupos que no nadaron.

En otro modelo animal, utilizando hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*) sometidos a un programa de entrenamiento de intensidad progresiva al final de la fase de luz, el ritmo de melatonina se vio alterado, mostrando un retraso en la subida nocturna y permaneciendo su concentración elevada durante más tiempo (Díaz y Colmenero, 2007). Este resultado fue similar al observado en humanos (Barger y cols., 2004). Los resultados sugieren que el ejercicio puede ayudar a facilitar la adaptación circadiana a los horarios que requieren un retraso en el ciclo sueño-vigilia.

- **Estudios en humanos**

Con relación a los humanos, aunque algunos estudios muestran que el ejercicio físico puede aumentar los niveles plasmáticos de melatonina diurnos en sujetos sanos (Strassman y cols., 1989), otros resultados han indicado que situaciones estresantes, algunas de las cuales provocan respuesta intensa en el sistema nervioso simpático y otros sistemas hormonales, no inducen subida alguna en los niveles de melatonina



plasmática durante el día (Theintz y cols., 1984; Vaughan, 1986), mostrando que la epíffisis humana no responde durante el día a la estimulación simpática.

No obstante la influencia del ejercicio sobre los cambios que puede experimentar la producción de melatonina, depende de la carga y de la hora del día en la que se realiza (Atkinson, 2003). Valorando la concentración de melatonina salival en varones jóvenes, se observó que el aumento de melatonina fue más pronunciado en la mañana ( $11,1 \pm 8,7$  pg/mL) que en la tarde ( $5,1 \pm 5,7$  pg/mL). Además, la correlación entre la melatonina y la tasa cardiaca, fue significativamente mayor en la mañana que en la tarde; esta marcada tendencia en la mañana plantea la posibilidad, de que la hora del día altere la relación entre la actividad nerviosa simpática mediada por el ejercicio y la secreción de melatonina (Marrin y cols., 2011).

Algunos estudios han demostrado que el ejercicio intenso, como la carrera de larga distancia, durante el día puede incrementar los niveles de melatonina, particularmente en mujeres (Carr y cols., 1981; Ronkainen y cols., 1986), habiendo encontrado que los niveles de la hormona regresan a los valores basales a los 30-60 minutos después del ejercicio. La producción de melatonina en jóvenes atletas presentó niveles significativamente elevados a los de las jóvenes sedentarias (Díaz y cols., 1993). Knight y cols., (2005) encontraron que el factor más importante en la secreción de melatonina en mujeres, fue la duración del ejercicio, el cual producía un aumento considerable de sus niveles plasmáticos. Vieron que el ejercicio a última hora del día producía un incremento mayor de esos niveles, y no hubo diferencias entre el ejercicio moderado y el extremo.

Buxton y cols. (1997) encontraron una aparente interacción entre la intensidad del ejercicio y la secreción de melatonina. Niveles bajos de actividad (40-60% de  $VO_2$  máximo durante 3 horas) no influían sobre los niveles de melatonina plasmática, pero un ejercicio más intenso (75% de  $VO_2$  máximo durante 1 hora) resultaba en un incremento acusado de la secreción de melatonina. También se ha observado que el entrenamiento vigoroso puede atenuar en lugar de incrementar la respuesta de la melatonina al ejercicio (Skrinar y cols., 1989).

Lucía y cols. 2001 estudiaron la respuesta de la melatonina al ejercicio de

resistencia aeróbica durante una competición ciclista profesional (La Vuelta Ciclista a España) de tres semanas de duración. Se valoraron los niveles de  $\alpha$ MT6S en orina por la mañana (previo al ejercicio) y por la tarde (después del ejercicio), antes de comenzar la competición y al finalizar la primera, segunda y tercera semana de la misma. Los resultados mostraron que antes de comenzar la competición, los niveles basales de  $\alpha$ MT6S por la mañana fueron significativamente más altos que los hallados por la tarde. Sin embargo, al final de las semanas: primera, segunda y tercera de competición, los niveles de  $\alpha$ MT6S por la tarde fueron superiores a los de la mañana. Además, tanto los niveles de  $\alpha$ MT6S observados en la mañana como en la tarde, fueron disminuyendo a lo largo de la competición. Los resultados, por tanto, ratifican el aumento de la secreción de melatonina como respuesta al estrés del ejercicio. Los datos sugieren además una reducción nocturna de la síntesis de melatonina provocada por la realización continuada de ejercicio de alta intensidad, por encima del umbral del lactato (superior al 75%  $VO_2$  máxima) y de larga duración (71 minutos en cada etapa).

Estos estudios valoraban el efecto de diferentes estímulos sobre los niveles de melatonina diurnos, cuando la glándula pineal se halla en estado quiescente. Sin embargo, Monteleone y cols. (1990) estudiaron los efectos del ejercicio físico cuando la glándula pineal está fisiológicamente activada por la oscuridad, y los niveles de melatonina son elevados. Para ello, seleccionaron siete hombres sanos entre 26-33 años de edad a los que se sometió a una prueba de ejercicio físico, entre las 10:40 y 23:00 horas. El ejercicio consistió, en pedalear en un cicloergómetro, al 50% de la capacidad máxima de trabajo personal, durante 10 minutos, seguido de otros 10 minutos de pedaleo al 80% de la capacidad máxima de trabajo de cada sujeto. Los resultados demostraron claramente, y por primera vez en humanos, que el estrés físico por la noche, detuvo significativamente el incremento nocturno de los niveles de melatonina en plasma. Monteleone y cols. (1992a), también mostraron que el ejercicio forzado incrementaba la secreción de cortisol, lo cual iba precedido de un disparo de la secreción de melatonina nocturna. Ellos sugieren algún tipo de unión causal entre el cortisol y la melatonina en respuesta al ejercicio. En otro estudio del mismo grupo (Monteleone y cols., 1992b) encontraron que el ejercicio no afectaba a los niveles de melatonina nocturnos, los cuales habían sido deprimidos “a priori” por luz natural.

## 1.4.- El Citrato

### 1.4.1.- Implicaciones del citrato en la formación de energía

El citrato es un compuesto que sirve para valorar la producción o gasto de energía, ya que es uno de los sustratos del ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico), ciclo esencial para la producción de energía oxidativa. El citrato se sintetiza a partir de oxalacetato y acetil CoA, cuya reacción es catalizada por el enzima citrato sintasa (CS) e inhibida alostéricamente por el ATP. Así, a medida que el nivel de ATP aumenta, queda saturado con acetil CoA una menor proporción de este enzima y por ello se forma menos citrato, ajustando con precisión la velocidad del ciclo para satisfacer las necesidades celulares de ATP (Weigand y Remington, 1986). De modo que niveles bajos de citrato, indicarán una mayor existencia de ATP derivada de un consumo o metabolismo energético menos importante.

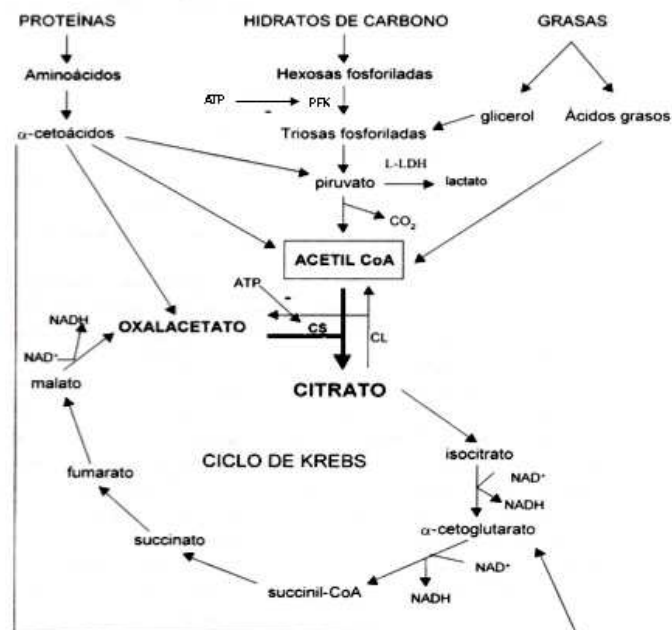


Figura 6. Procesos catabólicos para la obtención de energía. CL: citrato liasa; L-LDH: L-lactato deshidrogenasa; NAD<sup>+</sup>: dinucleótido de nicotinamida oxidado; NADH: dinucleótido de nicotinamida reducido; PFK: fosfofructoquinasa.

En condiciones normales la velocidad de la glucólisis y la del ciclo del ácido cítrico se hallan coordinadas, de modo que sólo se degrada la cantidad de glucosa que ha de formar el piruvato necesario para suministrar combustible al ciclo del ácido cítrico. Normalmente no se acumulan niveles elevados de piruvato, lactato o acetil CoA, sus concentraciones tienden a mantenerse en un estado estacionario dinámico. La velocidad de la glucólisis está ajustada a la velocidad del Ciclo de Krebs, no sólo por la inhibición de los niveles elevados de ATP, sino también por la concentración de citrato, que actúa como un inhibidor alostérico de la fosfofructoquinasa (PFK). La PFK es uno de los principales puntos de regulación de la glucólisis, la cual posee muchos moduladores e inhibidores, siendo el ATP y el citrato sus inhibidores más importantes. Cuando la célula tiene un nivel de ATP elevado, la actividad PFK baja, y el citrato existente acentúa su acción inhibidora. Por lo cual se producirá una disminución de la glucólisis, aumentando la lipólisis, obteniendo la energía fundamentalmente a partir de la oxidación de los ácidos grasos (Krebs y Johnson, 1988). Esto permite usar el glucógeno muscular y hepático a un ritmo más lento.

### **1.4.2.- Intermediarios del ácido cítrico**

La mayor producción de intermediarios del ciclo del ácido cítrico (ICAC), está relacionada de forma exponencial con la intensidad de trabajo. Si bien, varios mecanismos pueden contribuir potencialmente al aumento de dichos intermediarios, la concentración de citrato es un marcador importante de dicho proceso. La expansión de los ICAC ha sido propuesta como una capacidad importante para la provisión de energía aeróbica. El nivel de los ICAC es indicador de la utilización de energía durante el ejercicio, así sus valores aumentaron con cargas de trabajo de nivel moderado y alto, realizadas por sujetos sobre cicloergómetros, correspondiendo a un 50-80% de su  $VO_2$  máximo (Sahlin y cols., 1995). Sin embargo, estudios publicados en 1998 (Graham y Gibala, 1998) exponen que la comprensión del significado fisiológico de los ICAC es limitada, ya que aún se especula si el aumento de producción de ICAC presenta una señal reguladora importante de la provisión de energía aeróbica, o es simplemente una consecuencia del gran aumento del flujo metabólico que ocurre durante el ejercicio.

### **1.4.3.- Metabolismo del ácido cítrico**

El citrato circulante en la sangre se encuentra en un rango de concentración entre 1 a 6 mg/dL (0,05-0,25 mmol) (Walter, 1961). Sólo una pequeña parte del citrato de la dieta se metaboliza, la mayor proporción de citrato sanguíneo proviene del hueso y en segundo lugar del músculo estriado. El hígado y el riñón son los órganos que utilizan principalmente el citrato para diversas funciones metabólicas (Goodwin, 1968). En el hígado tiene importancia por su interacción en la biosíntesis de los ácidos grasos y en la gluconeogénesis (Nehلمان y Hanson, 1972) y en el riñón porque le proporciona un 10% de su energía (Simpson, 1983).

El ácido cítrico exógeno se destruye durante los procesos de digestión por lo que a la orina llega sólo una pequeña porción, prácticamente todo el ácido cítrico de la orina es endógeno (Elliot y Eusebio, 1965). La eliminación urinaria de citrato es de  $3,4 \pm 0,7$  mmol/día, unos 537,6 mg/día, o sea, cinco veces su concentración en plasma (Grollman y cols., 1961). Al efectuar, en animales de experimentación, una nefrectomía, se produce un ascenso en las concentraciones plasmáticas de citrato, indicando la importancia del riñón sobre el metabolismo del citrato. El citrato libre es filtrado por el glomérulo, y en humanos del 65 al 90% del citrato filtrado es reabsorbido por las células tubulares (Hamm, 1990).

La valoración de citrato urinario, se ha usado fundamentalmente para el estudio de la formación de cristales de oxalacetato cálcico en riñón, así como para el avance del conocimiento sobre la prevención de la formación de piedras durante la cristaluria, sobre lo que existen numerosas publicaciones (Zacchia y Preisig, 2010).

### **1.4.4.- Citrato sintasa y ejercicio físico**

Hasta el día de hoy sólo estudios de nuestro grupo han considerado al citrato como indicador de la recuperación metabólica en el deportista, aunque sí que se han publicado numerosos estudios sobre los efectos del ejercicio en la actividad del enzima CS, enzima que cataliza la reacción para la formación del citrato. Paso a citar algunos ejemplos, clasificándolos según el tipo de entrenamiento utilizado en los mismos.

- **Citrato sintasa y el entrenamiento de velocidad**

En el deporte podríamos definir velocidad como la capacidad de realizar una o varias acciones motrices en el menor tiempo posible.

Barnett y colaboradores (2004), con el fin de examinar la influencia del entrenamiento sobre el metabolismo y el ejercicio realizado durante el sprint, estudiaron a 16 hombres no deportistas, que fueron adjudicados bien al grupo control o al de entrenamiento. Cada sujeto realizó un sprint en bicicleta de 30 segundos y un test para medir su VO<sub>2</sub> máximo antes y tras 8 semanas de entrenamiento de sprint. El grupo de entrenamiento completó una serie de sprints 3 veces por semana que fueron desde 3 ciclos de 30 segundos en las semanas 1 y 2, hasta 6 sprints de 30 segundos en las semanas 7 y 8. Las muestras de músculo fueron obtenidas durante el pre-entrenamiento y el post-entrenamiento del sprint, en descanso e inmediatamente tras el ejercicio. El entrenamiento resultó en un aumento del 42% ( $p < 0,01$ ) de la actividad CS, pero la degradación de glucógeno durante el ejercicio de sprint no se vio afectada por el entrenamiento. Estos datos demuestran que el entrenamiento de sprint puede mejorar la capacidad oxidativa del músculo. La actividad enzimática mitocondrial aumenta sobre todo con el entrenamiento de sprints largos, mayores de 10 segundos, o con sprints cortos, menores de 10 segundos, con pequeños periodos de recuperación entre ellos (Ross y Leveritt, 2001).

En otro estudio, tras 2 semanas de entrenamiento interválico diario de unos 15 minutos de ejercicio intenso, éste aumentó el potencial oxidativo del músculo, elevando la actividad CS en un 38% y duplicando la capacidad de resistencia durante el ejercicio intenso aeróbico (Burgomaster y cols., 2005). El ejercicio interválico de alta intensidad y bajo volumen induce en el músculo esquelético adaptaciones metabólicas, incrementa la actividad máxima del enzima CS así como el contenido total de proteína CS, y produce un rendimiento semejante al del entrenamiento de resistencia tradicional (Little y cols., 2010).

El mismo grupo (Hood y cols., 2011) investigó la influencia del entrenamiento interválico de baja intensidad sobre la capacidad oxidativa muscular. Para lo cual 7 sujetos sedentarios realizaron durante 2 semanas un entrenamiento en cicloergómetro

(60% VO<sub>2</sub> máxima). Cada día de entrenamiento constaba de 10 sprints de un minuto, con un minuto de recuperación entre sprints. Tras el último entrenamiento, la capacidad oxidativa aumentó un 35%, como reflejó el alto contenido proteico de CS y de la subunidad IV de la citrocromo oxidasa.

Aunque el sprint es anaeróbico por naturaleza, parte de la energía usada durante la realización de sprints más prolongados proviene del metabolismo oxidativo, por lo que la capacidad aeróbica muscular puede incrementarse también con este tipo de entrenamiento.

El entrenamiento anaeróbico no impone estrés sólo sobre los sistemas anaeróbicos de energía, parte de la energía necesaria para los sprints, que duran un mínimo de 30 segundos, se obtiene a partir de energía oxidativa. En consecuencia, las series repetidas de ejercicio en que se tenga que esprintar también incrementan la capacidad aeróbica de los músculos (Saltin y cols., 1976; Costill y cols., 2001). Aunque este cambio con frecuencia es pequeño, podemos suponer razonablemente que esta mejora del potencial oxidativo del músculo, ayudará a que los esfuerzos de los sistemas anaeróbicos de energía satisfagan las necesidades musculares energéticas durante la realización de esfuerzos altamente anaeróbicos.

- **Citrato sintasa y el entrenamiento de resistencia aeróbica**

Definimos la resistencia aeróbica como la capacidad física y psíquica de soportar la fatiga frente a esfuerzos relativamente largos y/o a la capacidad de recuperación rápida tras los esfuerzos.

En un estudio se valoró la influencia del ejercicio físico (90 m, 60% VO<sub>2</sub> máximo) sobre la actividad CS y otros parámetros relacionados, en músculo esquelético de mujeres y hombres no entrenados o con entrenamiento de resistencia. Los resultados mostraron que la concentración de CS fue más alta en mujeres que en hombres, y que el control de CS parece ser dependiente del género (Roepstorff y cols., 2005). Igualmente el entrenamiento de resistencia durante 12 semanas proporcionó un estímulo para mejorar el potencial oxidativo del músculo, lo que resultó en un incremento de actividad CS (McKenzie y cols., 2000).

Se investigó durante 12 semanas, el efecto del entrenamiento de resistencia progresivo, tomando biopsias musculares del vasto lateral antes y después del entrenamiento. Los resultados mostraron que el entrenamiento de resistencia, proporcionó un estímulo para mejorar el potencial oxidativo del músculo, lo que se reflejó en un incremento de la actividad CS, y en una hipertrofia muscular (Tang y cols., 2006).

Para analizar el efecto de un entrenamiento interválico, fundamentalmente aeróbico (60%  $\text{VO}_2$  máximo) en humanos, 8 mujeres fueron sometidas al mismo durante 2 semanas. Como resultado se vio un incremento notable de la actividad enzimática mitocondrial (incluida la CS) y de la capacidad para oxidar los ácidos grasos libres durante el ejercicio (Talanian y cols., 2007; Talanian y cols., 2010).

En pacientes diabéticos de tipo 2, se estudió la oxidación lipídica total del cuerpo por calorimetría indirecta durante el ejercicio progresivo de resistencia, así como la capacidad oxidativa muscular, respiración mitocondrial y actividad CS, antes y tras un programa de entrenamiento. Se observó una mejoría de la oxidación lipídica correlacionada con una mejora de la respiración mitocondrial y de la actividad CS. Luego el entrenamiento moderado mejora la capacidad de oxidación de lípidos durante el ejercicio y está asociado a un aumento de la capacidad oxidativa del músculo (Bordenave y cols., 2008; Hansen y cols., 2009). Esto permite usar el glucógeno muscular y hepático a un ritmo más lento.

En ratas Fisher 344BN-hybrid de mediana edad, modelo animal utilizado dado que viven el tiempo suficiente para poder estudiar la reducción de la masa muscular con la edad, se estudiaron los efectos de un entrenamiento en tapiz rodante de 60 minutos/día a velocidad en aumento progresivo, durante 7 semanas, 5 días a la semana. En las tres últimas semanas se sometieron a intervalos de 2 minutos de ejercicio de alta intensidad, para aumentar el estímulo del entrenamiento. El entrenamiento de mayor resistencia produjo mayor actividad CS y de las enzimas del complejo IV de la cadena respiratoria en los músculos gastrocnemio y plantar, comparados con los de controles sedentarios, lo cual indica que el entrenamiento en estas ratas de mediana edad mejoró la función aeróbica y las actividades de las enzimas mitocondriales (Betik y cols., 2008).



En caballos, el efecto del entrenamiento realizado sobre un tapiz rodante durante 10 semanas, aumentó la capacidad aeróbica máxima del músculo esquelético un 22%, e igualmente aumentó la actividad CS muscular (Kim y cols., 2005).

Todos estos datos muestran como un gasto energético elevado y su consecuente caída de ATP se acompañan de una mayor actividad del enzima CS, y por consiguiente una mayor producción de citrato, lo cual viene a corroborar la hipótesis de que el citrato puede ser un buen indicador del metabolismo oxidativo y de la carga de trabajo generada por el ejercicio.

## **1.5.- El Balance Hídrico**

A pesar de que el 60% del peso corporal en humanos está constituido por agua, no existe un mecanismo eficiente de almacenamiento hídrico corporal, con lo que se debe realizar un aporte constante de líquidos para mantener los niveles estables en el organismo. El equilibrio del agua corporal es el resultado del balance entre la ingesta y la pérdida de agua (Mudge y Weiner, 1990).

### **1.5.1.- Regulación del balance hídrico**

La regulación de la osmolaridad y del volumen de los fluidos corporales constituye un proceso fundamental para la supervivencia y el correcto funcionamiento de un organismo bajo situaciones cambiantes. En primer lugar, la osmolaridad de los líquidos corporales está controlada hormonalmente por la vasopresina u hormona antidiurética (AVP), mensajero químico liberado por la hipófisis posterior, que regula la absorción de agua por el riñón y por un comportamiento, la sed, que regula la ingesta de agua. En segundo lugar, el volumen de líquido extracelular está determinado hormonalmente por la Angiotensina II, y por la cantidad de soluto osmóticamente activo que contiene. El sodio ( $\text{Na}^+$ ) es el soluto activo más importante del cuerpo, por lo que los mecanismos que controlan el equilibrio de  $\text{Na}^+$  controlan también el volumen de líquido extracelular (Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues y cols., 2004).

Parecen existir tres sensores fisiológicos principales para la sed: los osmorreceptores cerebrales, los osmorreceptores extracerebrales o viscerales y los receptores de volumen o volorreceptores.

Los osmorreceptores responden a la deshidratación celular (provocando la sed intracelular u osmótica), lo que ocurre cuando los fluidos salen de la célula como resultado de las fuerzas osmóticas. Los receptores de volumen responden a la deshidratación extracelular (provocando una sed extracelular o volémica) que se produce por una pérdida de fluidos en los espacios vasculares e intersticiales. Con respecto a su sensibilidad, los osmorreceptores responden a pequeños aumentos en la

osmolaridad plasmática (1-4%), mientras que los receptores de volumen se activan por pérdidas de fluidos corporales más drásticas (10%) (Bourque, 2008).

Los estudios clásicos de Verney (1947) sobre la sed intracelular, postulaban la presencia de receptores involucrados en la regulación de la osmolaridad y en la liberación de hormona antidiurética. Estos osmorreceptores son células que responden a los cambios en la presión osmótica o en la concentración plasmática de sodio en el líquido cefalorraquídeo. Estas células parecen concentrarse mayoritariamente en el área hipotalámica del cerebro. Otros osmorreceptores han sido localizados en la región orofaríngea (Kuramochi y Kobayashi, 2000), tracto gastrointestinal (Dooley y Valenzuela, 1984, Carlson y cols., 1997), en el sistema portal del hígado (Choi-Kwon y Baerschi, 1991) y en el hígado (Adachi y cols., 1976; Adachi, 1994), que responden a la ingestión de líquidos detectando la osmolaridad de las sustancias ingeridas, induciendo una respuesta anticipatoria a posibles perturbaciones osmóticas relacionadas con la ingesta (Haberich, 1968).

El segundo tipo de sed, la denominada sed extracelular (o volémica) puede producirse por una disminución en el volumen del compartimento extracelular, como ocurre tras una hemorragia o, por una deshidratación severa. Este comportamiento ingestivo se origina por estimulación de receptores de volumen o presión situados en los grandes vasos y en las aurículas, son los volo o presorreceptores. La caída de la presión y del flujo sanguíneo también provoca la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona que favorece la conservación de los líquidos corporales reduciendo por ejemplo la emisión de orina (Antunes-Rodrigues y cols., 2004).

La inducción conjunta de sed osmótica y volémica (Figura 7), genera un efecto aditivo sobre la ingesta de agua y sobre la liberación de AVP (Striker y Sved, 2002), acorde con la posible independencia funcional de ambos mecanismos (Johnson y Thunhorst, 1997).

Perdemos agua continuamente a través de la piel y durante el proceso de la respiración, en las heces, en la orina y en la transpiración normal. Para vivir y respirar, incluso en un clima templado, se requieren unos 2,5 litros al día. El ejercicio aumenta la transpiración, la pérdida de agua y, por consiguiente, la necesidad de líquido (Barr, 1999). Las alteraciones en el balance hídrico provocadas por la realización de pruebas

físicas de una determinada intensidad o duración no sólo afectan al rendimiento, sino que también incrementan las posibilidades de provocar algún tipo de lesión o daño al deportista (Bellido y de Luis, 2006; Johnson, 2007). Estudios más profundos de la respuesta del sistema nervioso autónomo y de variables bioquímicas relacionadas con la regulación hidromineral, podrían proporcionar mejores estrategias para mantener y restaurar la homeostasis de los fluidos corporales, y así poder prevenir posibles efectos negativos sobre la salud.

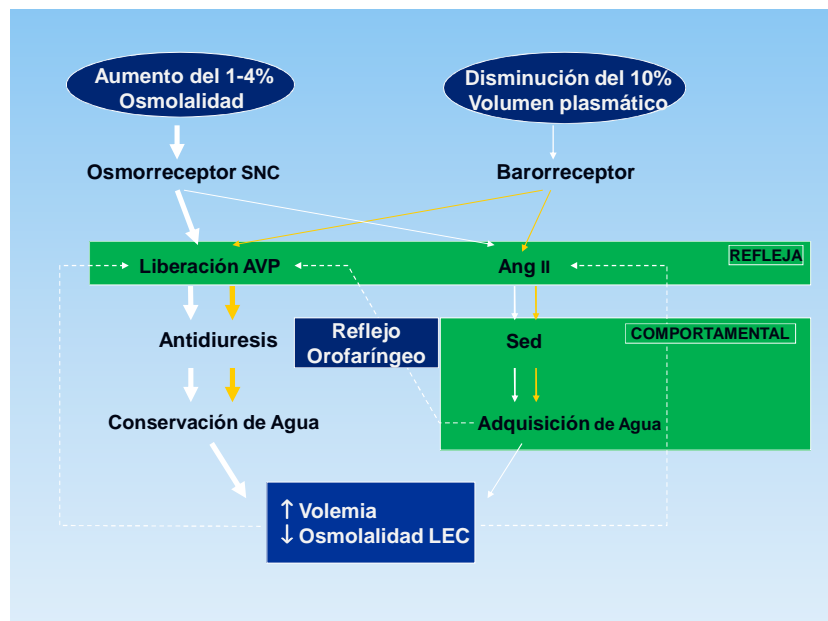


Figura 7. Mecanismos de regulación del balance hídrico (Modificado de Wilson y Foxter, 1998).

### 1.5.2.- El sistema hipotálamo-hipofisario

El hipotálamo es una estructura diencefálica, situada bajo el tálamo a ambos lados del tercer ventrículo, que constituye el principal centro responsable de la coordinación del sistema endocrino y del sistema nervioso autónomo, recibiendo información del córtex cerebral e interpretando los estímulos ambientales externos.

En la región anterior del hipotálamo se han encontrado células osmorreceptoras que mandan señales a otras neuronas hipotalámicas cercanas, como son las neuronas del núcleo paraventricular (PVN) y las del núcleo supraóptico (SON)

(Figura 8). Estos núcleos forman parte del sistema hipotálamo-hipofisario (Johnson y Thunhorst, 1997; Guyton y Hall, 2007).

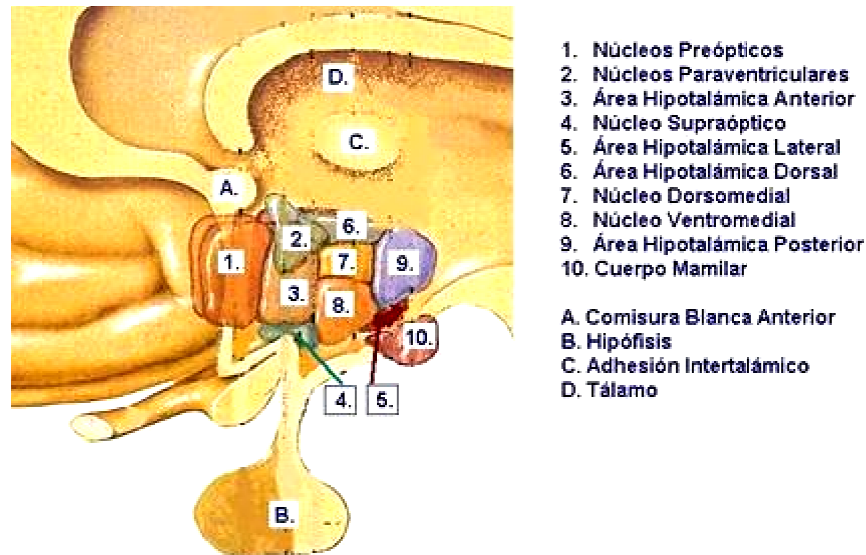


Figura 8. Núcleos hipotalámicos (Felten y cols., 2010).

Las neuronas de estos núcleos en base a su tamaño se clasifican en dos tipos: magnocelulares y parvocelulares. El SON está formado exclusivamente por neuronas magnocelulares, mientras que el PVN posee los dos tipos celulares. Las neuronas magnocelulares proyectan sus axones hacia la neurohipófisis (Brownstein y cols., 1980; Armstrong, 1995; Hatton, 1997) mientras que las neuronas parvocelulares dirigen sus señales hacia la eminencia media, bulbo raquídeo y médula espinal. Estas señales están involucradas en la secreción de hormonas en la hipófisis anterior o adenohipófisis, e implicadas en la regulación del sistema nervioso autónomo (Swanson y Kuypers, 1980; Swanson y Sawchenko, 1983).

Las neuronas parvocelulares del PVN liberan AVP y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en la eminencia media, que son transportadas por el sistema vascular portal a la adenohipófisis (Figura 9), donde desencadenan un aumento de la secreción de hormona adrenocorticotropica (ACTH). Esta es transportada a la corteza adrenal donde estimula la secreción de glucocorticoides, como por ejemplo el cortisol. Entre las principales funciones de los glucocorticoides se encuentran, aumentar la

gluconeogénesis hepática, elevar la glucemia en sangre, acelerar el catabolismo proteico, estimular la lipogénesis y acción antiinflamatoria (Croiset y cols., 2000; Carrasco y Van de Kar, 2003).

La neurohipófisis, conocida también como hipófisis posterior o lóbulo posterior de la hipófisis, se compone de células similares a las gliales, denominadas pituiticos. Estas células nerviosas no secretan hormonas, sino que constituyen estructuras de sostén para un gran número de fibras nerviosas terminales y de terminaciones nerviosas de las vías procedentes del PVN y del SON del hipotálamo (Figura 9). Estas vías acceden a la neurohipófisis a través del tallo hipofisario. Las terminaciones nerviosas son nódulos bulbosos que poseen numerosos gránulos secretores que reposan sobre la superficie de los capilares, hacia los que secretan dos hormonas neurohipofisarias: AVP y oxitocina (OT). La AVP se forma principalmente en el SON, mientras que la oxitocina se forma principalmente en el PVN. Cada uno de estos núcleos puede sintetizar, además de su hormona correspondiente, hasta una sexta parte de la otra (Langraf y cols., 1990).

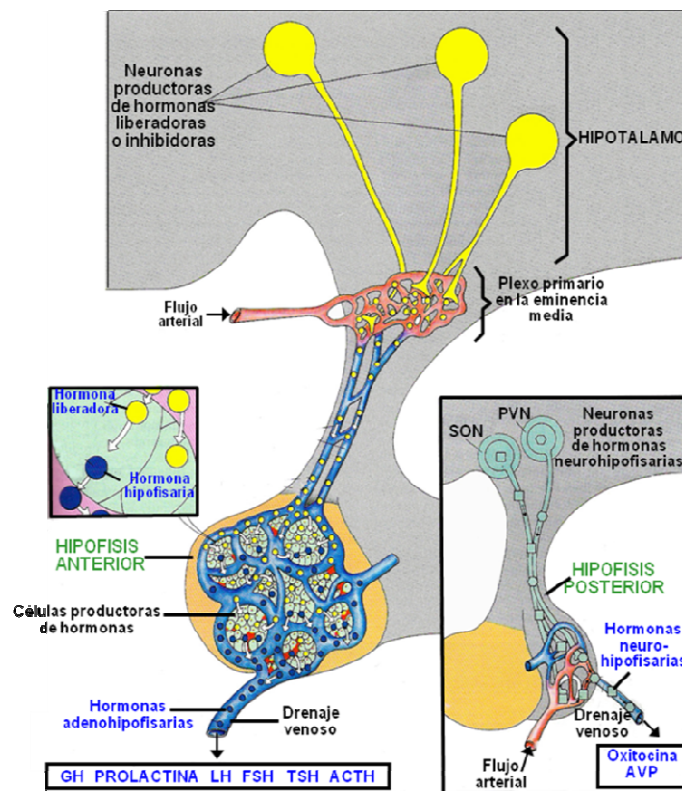


Figura 9. Vías de comunicación entre hipotálamo e hipófisis (Guyton y Hall, 2007).

### **1.5.3.- Centros reguladores de la vasopresina u hormona antidiurética**

- **Control osmótico**

Cambios en la osmolaridad del líquido extracelular hacen que se contraigan por fuerzas osmóticas las células osmorreceptoras localizadas cerca del SON y del PVN, produciéndose un envío de señales nerviosas a sus neuronas magnocelulares, estimulándose la liberación de AVP (Bourque, 2008). La secreción de AVP se activa cuando la presión osmótica se incrementa sólo un 1-2%, intentando prevenir una posible deshidratación (Robertson, 1984). La secreción hormonal por parte de los núcleos SON y PVN parece modulada cuantitativamente por la osmolaridad plasmática. Así, la inyección intraperitoneal de agua (que reduce la osmolaridad), inhibió a las células neurosecretoras (Brimble y Dyball, 1977; Bisset y Chowdrey, 1988) mientras que las hipertónicas, incrementaron su frecuencia de disparo (Honda y cols., 1985; Bourque y cols., 1994). El AVP entra en el torrente sanguíneo y es transportada hasta los riñones donde aumenta la permeabilidad del agua en la parte distal de la nefrona. Esto hace que aumente la reabsorción de agua y la orina sea más concentrada, conservándose agua mientras que continúan excretándose en orina, sodio y otros solutos.

Una de las técnicas de estudio que se ha utilizado desde hace años como marcador de la actividad hipotalámica bajo un protocolo de activación osmótica sistémica, es la expresión de la proteína Fos (Hamamura y cols., 1992). Se ha descrito en ratas como la privación de agua durante 24 horas fue capaz de aumentar la expresión de la proteína c-Fos tanto en el PVN como en el SON (Sagar y cols., 1988). Del mismo modo se detectó una activación transitoria de la expresión de proteína c-Fos en diferentes lugares del sistema nervioso central (SNC), por ejemplo en neuronas magnocelulares del SON y PVN del hipotálamo después de la inyección de solución hipertónica. Esta activación se mantuvo con un estímulo osmótico inducido por ingesta de solución hipertónica o por supresión de la ingesta de agua (Miyata y cols., 1994).

Andersson, McCann y colaboradores (Andersson y cols., 1955; Andersson y McCann, 1956; Andersson y cols., 1966; Andersson, 1977) postularon la existencia de

osmorreceptores en algunas de las zonas del cerebro que carecían de barrera hematoencefálica, por ejemplo en los órganos circunventriculares (CVO<sub>s</sub>). Alguno de estos CVO<sub>s</sub> implicados en la osmorregulación se encuentran situados en el hipotálamo, concretamente en la región anteroventral del tercer ventrículo (AV3V). El órgano subfornical (SFO) es uno de ellos. El SFO tiene conexiones directas a través de células neuronales con el PVN y el SON. La estimulación eléctrica de este núcleo activa al SON y PVN (Honda y cols., 1985; Yang y cols., 1999) e induce la secreción de hormonas neurohipofisarias (Blackburn y cols., 1992; Leng y cols., 1999). Parece además implicado en la inducción a la sed en respuesta a una osmolaridad extracelular alta (Antunes-Rodrigues y McCann, 1970; McKinley y Johnson, 2004; Hoffmann y cols., 2006).

- **Control del volumen extracelular**

Las células vasopresinérgicas en el PVN y en el SON reciben impulsos aferentes de volorreceptores y barorreceptores arteriales y cardiopulmonares, en particular de los localizados en la aurícula izquierda (Thrasher, 1994; Fitzsimons, 1998). Estos últimos, se estimulan por un aumento de volumen, que a su vez genera un aumento en la presión auricular. Los impulsos que resultan se transmiten por vías ascendentes hacia el hipotálamo, donde inhiben a las células vasopresinérgicas (Renaud, 1996). El proceso inverso ocurriría si el volumen sanguíneo disminuyese alrededor de un 10% y la presión fuera más débil (Bisset y Chowdrey, 1988). De modo que la denervación sinaortica puede generar cambios en la ingesta de agua y en la actividad neurosecretora de estos centros (Rocha y cols., 1985). Esta información se transmite a través de los nervios craneales, vago o glossofaríngeos, hasta el núcleo del tracto solitario en el tronco encefálico, desde el cual, por vía postsináptica conecta con las neuronas magnocelulares del SON y PVN (Share, 1988; Duan y cols., 1997). El valor adaptativo de este reflejo es ayudar a restablecer el volumen extracelular y la presión sanguínea.



#### 1.5.4.- Centros reguladores del sistema renina-angiotensina-aldosterona

En 1898, Tigerstedt y Bergman, a partir de extractos acuosos y alcohólicos de corteza renal de conejo, obtuvieron una sustancia que tenía efecto vasopresor cuando se inyectaba por vía intravenosa, y la llamaron renina. Cuando disminuyó el flujo y la presión sanguínea en la arteria renal, las células yuxtaglomerulares del riñón respondieron segregando, la enzima renina a la sangre (Vander, 1967). La renina cataliza la hidrólisis de una proteína plasmática denominada angiotensinógeno, para dar angiotensina I. Ésta, cuando atraviesa los capilares pulmonares, donde se encuentra el enzima de conversión de la angiotensina (ECA), se transforma en angiotensina II (Fitzsimons 1964; Saavedra, 1992). La angiotensina II estimula la secreción de aldosterona en la corteza suprarrenal, produciendo una mayor retención de sal y agua en los riñones. Por otra parte, activa los centros de la sed del hipotálamo y produce un aumento de la ingesta de líquido (Epstein y cols., 1970; Fitzsimons, 1998).

Desde hace años diferentes estudios han identificado receptores para la angiotensina II en el SFO, sugiriendo el papel regulador de la angiotensina II sobre la actividad del SFO (Saavedra y cols., 1986; Mendelsohn y cols., 1990). Un descenso del volumen sanguíneo producido por deshidratación extracelular estimuló la liberación de renina desde el riñón aumentando los niveles de angiotensina II que actúan sobre receptores de angiotensina II en el SFO (Stricker y Sved, 2000). Lesiones en el SFO y otras regiones AV3V causaron un descenso de la sed y de la liberación de AVP inducidas por la angiotensina II (Eng y Miselis, 1981; McKinley y cols., 1999; Stricker y Sved, 2002).

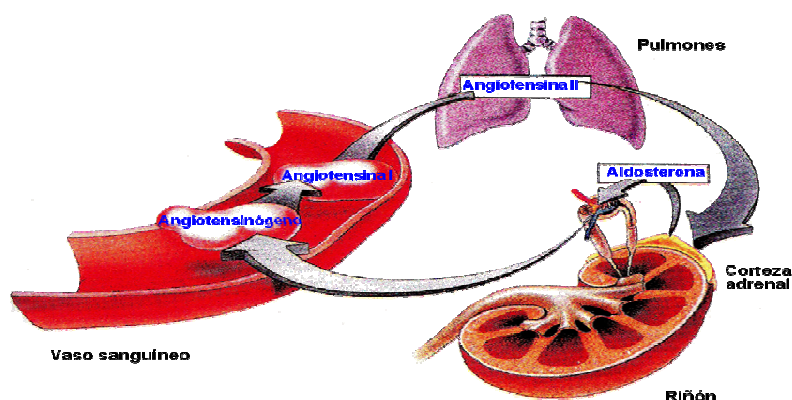


Figura 10. Esquema del sistema renina-angiotensina-aldosterona (modificado de Thibodeau, 2007).

### **1.5.5.- Balance hídrico y ejercicio físico**

La homeostasia de los fluidos durante el ejercicio es crítica para que haya una función cardiovascular y termorreguladora óptima. La deshidratación afecta al rendimiento de los deportistas porque disminuye la obtención de energía aeróbica por el músculo, dificulta el transporte del lactato lejos del músculo y disminuye su fuerza (González y cols., 1995).

Al inicio del ejercicio, el agua es desplazada desde el plasma a los espacios intersticiales o intracelulares (Costill y Fink, 1974). Este desplazamiento está relacionado con la masa muscular activa y con la intensidad del esfuerzo. Los productos metabólicos de desecho comienzan a acumularse en y alrededor de las fibras musculares, incrementando la presión osmótica. El agua es llevada hacia estas áreas. Del mismo modo, la mayor actividad muscular incrementa la tensión arterial, que, a su vez, retira agua de la sangre. Además durante el ejercicio aumenta la sudoración. El efecto combinado de estas acciones es que nuestros músculos comienzan a ganar agua a expensas del volumen sanguíneo (Wilmore y Costill, 2001).

Esto eleva la osmolaridad de la sangre. El aumento de la liberación de AVP parece ser dependiente de la intensidad del ejercicio, proporcional al movimiento del líquido desde el espacio intravascular al intersticial (Takamata y cols., 2000). El plasma concentrado circula y es detectado por el hipotálamo, el cual activa la secreción de AVP, lo que conlleva la conservación del agua. Hay estudios que muestran como un estímulo de un entrenamiento de una duración menor de 8 días, indujo una hipervolemia caracterizada por una mejor respuesta a la hormona AVP (y a la renina plasmática), siendo menor la diferencia entre la concentración plasmática de AVP en reposo y ante una nueva prueba de entrenamiento (Convertino y cols., 1980). Después de un entrenamiento a corto plazo, cuando la actividad física es la rutinaria, los niveles de AVP plasmática se normalizaron, no siendo diferentes a los observados en el periodo de pre-entrenamiento (Convertino y cols., 1983).

Durante un ejercicio máximo (superior al 90% VO<sub>2</sub> máximo) realizado hasta el agotamiento, se produjo un aumento claro en la concentración de AVP plasmática, que superó con creces los niveles previstos esperables por un aumento de presión osmótica o de volumen (Inder y cols., 1998; Hew-Butler y cols., 2008). De la misma

forma un incremento significativo de los niveles plasmáticos de AVP también ocurrió cuando la intensidad del ejercicio fue del 40-60% de VO<sub>2</sub> máximo (Convertino y cols., 1980; Freund y cols., 1990). El entrenamiento deportivo modula la relación entre AVP y la presión osmótica antes (Mudambo y cols., 1997), durante (Merry y cols., 2008) y después del ejercicio (Geysant y cols., 1981; Hew-Butler y cols., 2008), aunque no parece que haya una respuesta del organismo ante el entrenamiento en cuanto al comportamiento (beber “ad libitum”) o en la percepción de sed. Individuos entrenados y no entrenados experimentan la misma sensación de sed, y mantienen el mismo grado de “hipohidratación voluntaria” durante un ejercicio con hidratación “ad libitum” (Merry y cols., 2008).

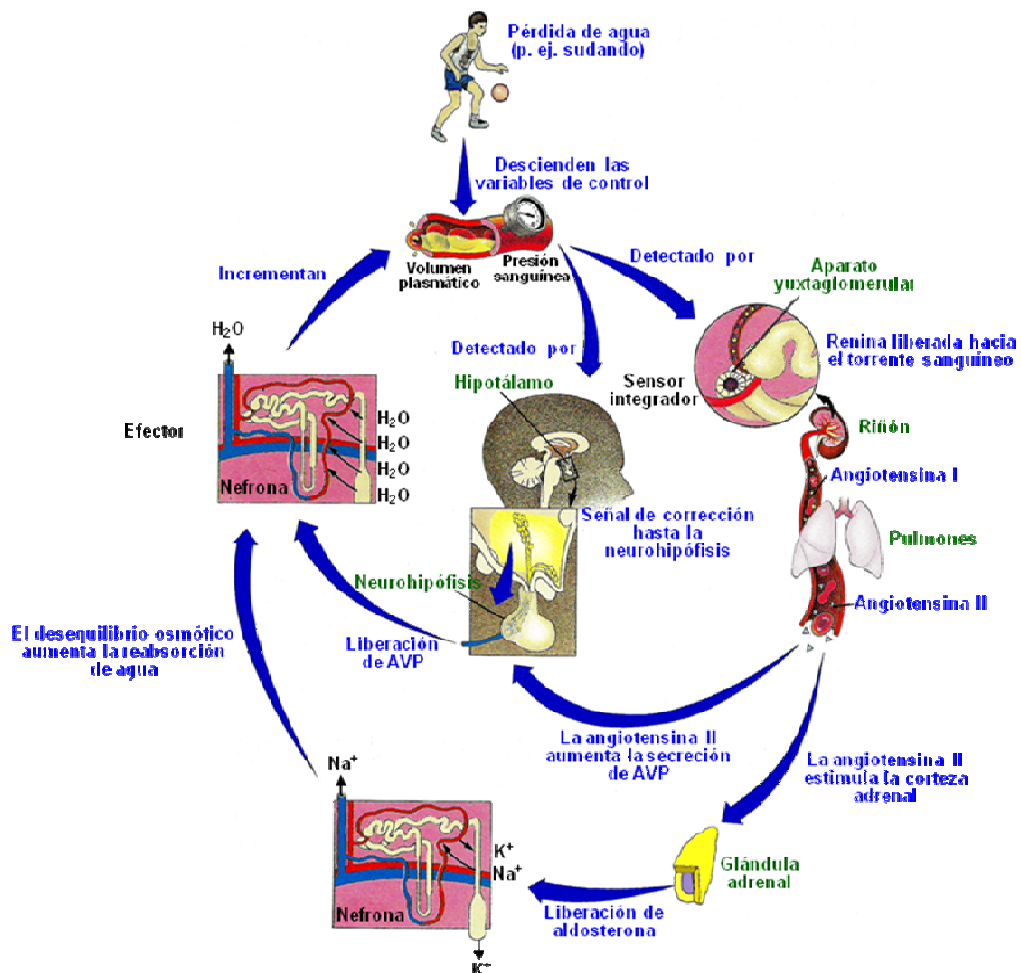


Figura 11. Balance hídrico y ejercicio (modificado de López-Chicharro y Fernández-Vaquero, 2006).

El incremento de AVP por unidad de presión osmótica durante el ejercicio, tendió a ser mayor que el incremento de AVP experimentado después de infundir una solución hipertónica salina, sugiriendo que otros factores están implicados en la estimulación de la secreción de AVP durante el ejercicio (Takamata y cols., 2000).

La identificación de regiones del cerebro, incluido el hipotálamo, activados durante un ejercicio de tipo carrera, se ha realizado mediante técnicas de biología molecular, como la inmunohistoquímica, a través de la expresión de genes inmediatos tipo c-fos/c-Fos (Cullinan y cols., 1995, 1996; Singewald y cols., 2003). Existen investigaciones que muestran como aparecen neuronas c-fos inmunopositivas, magnocelulares y parvocelulares en el PVN en respuesta al estrés físico (Briski y Gillen, 2001). Estudios más recientes señalan que 30 minutos de carrera de una intensidad de moderada a alta, provocaron un aumento de la osmolaridad plasmática, y del número de células magnocelulares c-fos inmunopositivas en el SON y parvocelulares en el PVN (Saito y Soya., 2004). Sin embargo, la región magnocelular del PVN no presentó un aumento de neuronas c-fos inmunopositivas. Estos núcleos hipotalámicos se activan cuando la intensidad del ejercicio sea alta, como respuesta frente al estrés producido (Soya y cols., 2007).

La AVP no estimuló la síntesis de CRH y por sí misma presentó una débil actividad sobre su liberación, pero en cambio fue capaz de potenciar los efectos del CRH incrementando la liberación de ACTH (Rivier y Vale, 1983; Wittert y cols., 1991). Una vez AVP y CRH estimula la secreción de ACTH al torrente sanguíneo, se estimula la glándula adrenal liberando cortisol, inhibiendo posteriores secreciones de AVP, CRH y ACTH desde hipotálamo e hipófisis, terminando con la respuesta a estrés. Esto indica que el balance hídrico puede ser afectado por condiciones de estrés (Alexander y cols., 1991).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**









Existen muchos estudios que valoran la respuesta del organismo tras un esfuerzo físico de corta duración e intensidad elevada, la mayoría son estudios transversales, que no investigan los efectos a largo plazo de un entrenamiento. Se basan en competiciones simuladas o en pruebas de esfuerzo físico puntual en deportistas, que no suelen ser de alto nivel, o en sujetos sedentarios.

La carga de trabajo a la que los deportistas de alto rendimiento están expuestos, varía a lo largo del programa de entrenamiento. La carga externa del entrenamiento (intensidad, volumen), provoca una respuesta adaptativa del organismo, que repercute en su homeostasis (carga interna). No todos los seres humanos respondemos de igual forma ante una misma situación. Cada deportista puede responder de forma diferente ante una carga de trabajo idéntica. Cuando hay una recuperación deficiente y esta sobrecarga se arrastra durante semanas, el organismo experimenta una serie de alteraciones a nivel neuromuscular (descenso de la función muscular), neuroendocrino (altera las funciones del eje hipotálamo-hipófisis) y metabólico (descenso de los sustratos energéticos).

Es necesario establecer ensayos que permitan cuantificar la carga del entrenamiento y las repercusiones que ese ejercicio crónico puede acarrear a los deportistas, utilizando métodos lo más sencillos posibles. En el presente trabajo se cuantifican la melatonina y el citrato, ya que ambos se pueden determinar en orina mediante técnicas no invasivas.

El papel de las catecolaminas adrenales en la regulación de la síntesis de melatonina resulta de gran interés, dado que la síntesis de la misma está regulada por la noradrenalina liberada desde las terminales nerviosas simpáticas al parénquima pineal. Por lo cual se razonó, que una liberación de catecolaminas aumentada desde las glándulas adrenales durante una situación de estrés, como es el ejercicio físico, podría alterar la producción de melatonina pineal. Además, se ha recogido y cuantificado el citrato urinario. Considerando que el citrato es el primer catabolito del Ciclo de Krebs, su determinación nos puede indicar el grado del metabolismo oxidativo realizado durante los entrenamientos.

En esta tesis también se han investigado los efectos de un entrenamiento de carga progresiva sobre el organismo utilizando un modelo animal, en concreto en la rata de la cepa Wistar. El rendimiento físico en pruebas o competiciones está limitado en primera instancia, por la disponibilidad y transporte de oxígeno, y por las reservas de glucógeno muscular y hepático. Para valorar cambios metabólicos inducidos por el entrenamiento, se ha estudiado la actividad de uno de los principales enzimas mitocondriales de la vía oxidativa, del Ciclo de Krebs, que es la citrato sintasa. Además se ha recogido y cuantificado el citrato urinario de 24 horas, para conocer el patrón circadiano del mismo y si existe alguna asociación con la actividad citrato sintasa celular. Hasta este estudio no se tenía conocimiento del patrón de excreción de citrato en orina.

Por otro lado, existen además numerosos estudios que muestran una reducción de la capacidad de trabajo físico bajo la influencia de la deshidratación. Para estudiar los cambios que genera el entrenamiento sobre el balance hídrico y el eje hipotálamo-hipofisario que lo regula, se analizaron las alteraciones sobre la actividad neuronal, utilizando la técnica inmunohistoquímica para determinar el número de núcleos c-fos inmunorreactivos, de algunos de los centros hipotalámicos responsables de mantener la homeostasia de fluidos, que en algunos casos también parecen implicados en la respuesta endocrina al estrés como son los núcleos supraóptico, supraquiasmático y paraventricular, y el órgano subfornical. Así, como su relación con alteraciones en los valores de variables tales como la osmolaridad plasmática y urinaria, el hematocrito, la concentración de proteínas plasmáticas y la ingesta de líquidos.

## **OBJETIVOS**

- Utilizar técnicas no invasivas que nos permitan conocer mejor y de forma sencilla los efectos de la carga del entrenamiento de nadadores y piragüistas de alto rendimiento a lo largo de su temporada deportiva.
- Estimar el impacto del estrés del entrenamiento sobre el deportista, nadadores y piragüistas de alto rendimiento, mediante la excreción de 6-sulfatoximelatonina en orina, a lo largo de la temporada de entrenamiento.
- Valorar la recuperación metabólica en deportistas de alto rendimiento, nadadores y piragüistas, a través de la determinación de los niveles de citrato en orina, en los mismos momentos descritos para la 6-sulfatoximelatonina.
- Conocer en un modelo animal de entrenamiento de intensidad progresiva, el patrón de excreción de citrato urinario y la influencia del entrenamiento sobre el mismo.
- Cuantificar la actividad citrato sintasa en el hígado y en los músculos sóleo y gastrocnemio, así como estudiar las modificaciones que experimenta en esos tejidos tras un entrenamiento de intensidad progresiva.
- Estudiar los efectos del ejercicio de intensidad progresiva sobre la actividad neuronal de algunos de los centros hipotalámicos encargados de la regulación del balance hídrico, en ocasiones también asociados con la respuesta neuroendocrina al estrés. Relacionar los resultados con cambios en la osmolaridad plasmática y urinaria, el hematocrito, la concentración de proteínas plasmáticas y la ingesta de líquidos.





## **SUJETOS Y MÉTODOS**







### 3.1.- Estudio en Humanos

#### 3.1.1.- Sujetos de Estudio

Los sujetos de estudio son deportistas de alto rendimiento, nadadores y piragüistas. El primer grupo de estudio está formado por 12 nadadores de alto nivel (6 mujeres y 6 hombres) pertenecientes al Equipo Autónomo de Natación del Principado de Asturias, siendo su edad media  $17,0 \pm 2,0$  años, su altura  $175,2 \pm 6,6$  cm y su peso de  $66,2 \pm 6,5$  kg (Tabla 4).

Tabla 4. Datos antropométricos de los nadadores

	HOMBRES	MUJERES
EDAD (años)	$19,0 \pm 3,0$	$16,0 \pm 1,0$
ALTURA (cm)	$180,0 \pm 3,2$	$170,5 \pm 5,7$
PESO (kg)	$71,5 \pm 4,0$	$61,0 \pm 3,5$

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar.

El segundo grupo de estudio está formado por 12 piragüistas de alto nivel pertenecientes a la Selección Española Junior y Senior B, siendo su edad media  $18,0 \pm 1,0$  años, su altura  $177,8 \pm 6,7$  cm y su peso de  $75,9 \pm 7,4$  kg (Tabla 5).

Tabla 5. Datos antropométricos de los sujetos de estudio.

	HOMBRES
EDAD (años)	$17,0 \pm 5,0$
ALTURA (cm)	$179,1 \pm 5,1$
PESO (kg)	$77,3 \pm 5,9$

Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar.

Los nadadores y piragüistas se encuentran en régimen de concentración permanente en los Centros de Tecnificación Deportiva de El Cristo (Oviedo) y de Trasona (Corvera, Avilés) respectivamente. Manteniendo un horario de desayuno, comida y cena establecido y fijo durante todo el año. Además están bajo seguimiento y control médico habitual llevado a cabo por la Unidad Regional de Medicina Deportiva del Principado de Asturias.

En cumplimiento de los Acuerdos de Helsinki, los participantes y/o sus tutores (en el caso de los menores de edad) fueron informados de los objetivos y los procedimientos a realizar en el presente estudio, dando posteriormente su consentimiento por escrito.

### **3.1.2.- Características del Estudio**

El estudio fue realizado durante la temporada de entrenamiento 2005-2006. La planificación de los entrenamientos corre a cargo de los Centros Técnico Deportivos de Natación y Piragüismo del Principado de Asturias.

#### **3.1.2.1.- Nadadores**

Para los nadadores el régimen de entrenamiento depende del momento de la temporada deportiva, siendo 5 sesiones semanales en todas las fases, excepto en el Macro ciclo II donde son 12 las sesiones semanales.

#### ***a) Momentos de la temporada deportiva elegidos para el estudio***

##### 1. Inicio de la temporada de entrenamiento (06/11/2005)

Entrenamiento de 16.00- 19.30h.

Revisión y establecimiento de la forma deportiva general.

*Objetivos:* aeróbico lipolítico, aeróbico glucolítico, resistencia aeróbica.

*Intensidad de entrenamiento débil:* lactato 2 mmol/L.

2. Entrenamiento básico (18/11/2005)

Entrenamiento de 10.30-14.00h o de 16.00-19.30h

Orientación y transformación de las cargas realizadas en el Inicio de temporada.

*Objetivos:* aeróbico glucolítico, capacidad aeróbica, fuerza muscular hipertrófica.

*Intensidad de entrenamiento media:* lactato 5 mmol/L.

3. Macro ciclo I (15/02/2006)

Entrenamiento de 10.30-14.00h o de 16.00-19.30h.

*Objetivos:* resistencia aeróbica-anaeróbica, resistencia fuerza, perfeccionamiento técnico competición.

*Intensidad de entrenamiento:* nivel aeróbico-anaeróbico, lactato > 12 mmol/L.

4. Descanso activo (28/02/2006)

Entrenamiento de 10.30-14.00h o de 16.00-19.30h. Puesta a punto para competición.

*Objetivos:* Modelar competición, capacidad de velocidad, resistencia anaeróbica-táctica-técnica competición.

*Intensidad de entrenamiento:* nivel anaeróbico, lactato > 12 mmol/L.

5. Macro ciclo II (28/05/2006)

Entrenamiento de 10.30-14.00h y de 16.00-19.30h.

*Objetivos:* capacidad aeróbica, coordinación intramuscular, potencia aeróbica.

*Intensidad de entrenamiento:* media, lactato 5 mmol/L (mañana)

submáxima, lactato 8 mmol/L (tarde)

5. Descanso absoluto (26/07/2006)

Recogida de muestras tras una semana de vacaciones, sin ningún entrenamiento programado.

### **3.1.2.2.- Piragüistas**

Para los piragüistas el régimen de entrenamiento depende del momento de la temporada deportiva, pudiendo oscilar entre 5 y 8 las sesiones semanales. Siendo la media de 5 sesiones/semana (1 sesión de lunes a viernes por la tarde).

#### ***b) Momentos de la temporada deportiva elegidos para el estudio***

##### 1. Inicio de la temporada de entrenamiento (13/10/2005)

Entrenamiento de 16.00-20.00h.

Revisión y establecimiento de la forma deportiva general.

Entrenamientos en kayak a *ritmo R1*= aeróbico lipolítico extenso, 50-60 paladas/min.

*Intensidad de entrenamiento:* lactato de 1 mmol/L.

##### 2. Macro ciclo (02/06/2006)

Entrenamiento de 10.30-14.00h (3 días/semana) y de 16.00-19.30h (5 días/semana).

Entrenamiento de fuerza muscular 3 días a la semana.

Entrenamientos en kayak principalmente a *ritmo R3* (60-75 paladas/min) y *R4* (75-90 paladas/min). Y ritmos de competición.

*Intensidad de entrenamiento:*

*R3*= aeróbico glucolítico extenso. Lactatos de 4-8 mmol/L.

*R4*= glucolítico intenso (aeróbico y anaeróbico). Lactatos de 8-12 mmol/L.

##### 3. Descanso activo (01/07/2006)

Entrenamiento de 16.00-20.30h.

Puesta a punto para competición. Se disminuye el volumen de entrenamiento, se aumenta la intensidad y el número de descansos.

*Objetivos:* modelar competición, capacidad de velocidad, resistencia anaeróbica-táctica-técnica competición.

*Intensidad de entrenamiento:*

*R4*= Glucolítico intenso (aeróbico y anaeróbico). Lactatos de 8-12 mmol/L.

*Ritmo de Competición*= anaeróbico, 100 paladas/min. Lactatos de 14-16 mmol/L.

### **3.1.3.- Recogida de muestras de orina**

Se recoge el volumen total de orina antes de acostarse, entre las 22.00 y 22.30h y el volumen total de orina de la primera micción tras despertarse, en ayunas, y se guardan en nevera. Se transportan al laboratorio del Área de Fisiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, para su procesamiento. Allí se guardan en cámara fría a 4°C e inmediatamente después se inicia el procesamiento de las muestras de orina. Se mide el volumen total de orina de la muestra recogida, en cada tiempo para cada individuo. Se sacan alícuotas de 3 mL de cada una de ellas, se centrifugan 15 minutos a 3.000 r.p.m., se toman sus sobrenadantes y se guardan en tubos a -20°C para las posteriores determinaciones de citrato.

### **3.1.4.- Determinación de citrato en orina**

La determinación de ácido cítrico en orina fue realizada mediante técnicas de espectrofotometría utilizando el analizador automático Olympus AU600 del Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Central de Asturias, y kits comerciales (Boehringer Mannheim) basados en el método descrito por Welshman y McCambridge (1973); Toftegaard, (1976); Warty y cols. (1984), para la determinación de citrato en orina.

#### **3.1.4.1.- Reactivos**

- a) *Solución 1:* Contiene aproximadamente 1,4 g de liofilizado consistente en tampón gliacilglicina, pH=7,8, L-malato deshidrogenasa (L-MDH), aproximadamente 136 U, L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) aproximadamente 280 U, NADH aproximadamente 5 mg y estabilizadores. Se reconstituye con 12 mL de agua destilada. Una vez reconstituida es estable dos semanas a 4°C o cuatro semanas a -20°C. Es necesario poner la solución a temperatura ambiente previamente a su utilización (20-25°C).
- b) *Solución 2:* Contiene aproximadamente 50 mg de citrato liasa (CL) liofilizada, aproximadamente 12 U. Se reconstruye con 0,3 mL de agua destilada. Una vez reconstruida es estable una semana a 4°C, o cuatro semanas a -20°C.

### 3.1.4.2.- Fundamento del ensayo

El método se basa, en la determinación de NADH, mediante la medida de su absorbancia a 340 nm a dos tiempos diferentes, tras la adición de las dos soluciones, solución 1 y solución 2.

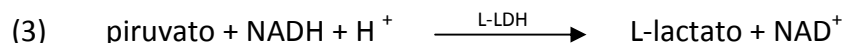
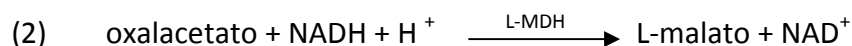
La primera medición de NADH, tras la adición de la solución 1, refleja la cantidad del dinucleótido presente en la muestra, el procedente de cualquier vía metabólica, más el que se añade en la propia solución 1.

La segunda medición de NADH, tras la adición de la solución 2, refleja el consumo del dinucleótido como consecuencia de las reacciones catalizadas por enzimas CL (reacción 1), L-MDH (reacción 2) y L-LDH (reacción 3), así:

El ácido cítrico es convertido en oxalacetato y acetil CoA en una reacción catalizada por la enzima CL, presente en la solución 2 (1)



A continuación, la presencia de los enzimas L-MDH y L-LDH, en la solución 1, provocan que el oxalacetato sea reducido a L-malato, y el piruvato, producto de la descarboxilación del oxalacetato, se reduzca a L-lactato, produciéndose en ambos casos la oxidación del NADH:



La cantidad de NADH oxidado en las reacciones (2) y (3) será proporcional a la cantidad del dinucleótido propiamente derivado del citrato presente en la muestra de orina, siendo este NADH determinado por la disminución de la absorbancia a longitud de onda de 340 nm.

*Sensibilidad:* la diferencia de absorbancias más pequeña capaz de detectar este método es 0,005 unidades de absorbancia, que con un volumen máximo de muestra (2 mL) y para una lectura de 340 nm correspondería a una concentración 0,25 mg/L.

*Linealidad:* existe linealidad desde 1 µg de ácido cítrico/ensayo (0,5 mg de ácido cítrico/L), con un volumen de muestra de 2 mL hasta 80 µg de ácido cítrico/ensayo (4 mg/L) con un volumen de muestra de 0,2 mL.

*Precisión:* utilizando una misma muestra para una doble determinación, puede observarse una diferencia de 0,005 a 0,010 unidades de absorbancia. Con un volumen de muestra de 0,2 mL y una medida a 340 nm, esto correspondería a una concentración de ácido cítrico de aproximadamente 0,03- 0,05 mg/L.

### 3.1.4.3.- Protocolo del ensayo

Tabla 6. Protocolo de ensayo para la cuantificación de citrato urinario

	BLANCO	MUESTRAS
<b>Solución 1</b>	1 mL	1 mL
<b>Muestra</b>		0,2 mL
<b>Agua destilada</b>	2 mL	1,8 mL

Mezclar, esperar 5 minutos, leer las absorbancias (A1) y comenzar la reacción por adición:

<b>Solución 2</b>	0,02 mL	0,02 mL
-------------------	---------	---------

Mezclar, esperar 5 minutos, leer las absorbancias se ajusta a cero el espectrofotómetro, usando dos cubetas vacías.

---

#### **3.1.4.4.- Cálculo de los Resultados**

Se calcula la diferencia de absorbancias (A1 - A2) tanto para el blanco como para cada una de las muestras, a continuación se resta la diferencia obtenida para el blanco a la diferencia obtenida para cada una de las muestras de orina.

$$\Delta A = (A1 - A2) \text{ muestra} - (A1 - A2) \text{ blanco}$$

$$c = \frac{V \times P.M.}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \times 100$$

*V* = volumen final (3,020 mL)

*v* = volumen de muestra (0,2 mL)

*P.M.* = peso molecular de la sustancia ensayada (192,1 g/mol)

*d* = longitud de la cubeta (1 cm)

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción de NADH a 340 nm (6,3 L/ mmol x cm)

*c* = mg/L



### **3.1.5.- Determinación de 6-sulfatoximelatonina en orina**

Para la valoración de la 6- Sulfatoximelatonina ( $\alpha$ MT6S), se siguió el método de Arendt y cols. (1985) que utiliza  $\alpha$ MT6S iodada (Aldhous y Arendt, 1988). La técnica utilizada fue radioinmunoensayo (RIA).

Se utilizaron kits comerciales de la casa Stockgrand LTD, University of Surrey, Guilford, Surrey GU 2 5XH, Inglaterra.

#### **3.1.5.1.- Reactivos**

a) *Tampón tricina*. (Sigma Ltd, T-0377), pH= 5,5, 0,1 M con 0,9% NaCl y 0,1% gelatina. Consta de 17,9 g de tricina, 0,9 g de NaCl y 1,0 de gelatina, que se añade a 1 L de agua bidestilada. Para disolver la gelatina se agita a 50°C durante 30 minutos. Se guarda a 4°C.

b) *Anticuerpo*. El anticuerpo utilizado fue AB/S/06, es un anticuerpo anti-6 sulfatoximelatonina obtenido de suero de oveja, que se suministra liofilizado, y que se reconstituye añadiendo 150 mL de agua bidestilada y 29,85 mL del tampón de ensayo, obteniendo una dilución final de 1:20.000. Se guarda a -20°C.

c) *“Charcoal dextran-coated”*. (Sistema de separación), 2% peso/volumen, conteniendo tampón dextrano T70 (Sigma Ltd, D1390) y carbón activo (Sigma Ltd C5260). Se guarda a 4°C

c)  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ MT6S. Antígeno radioactivo preparado por una adaptación de Vakkuri y cols. 1984. Actividad 4  $\mu$ curios. Esta solución stock debe ser diluida en el tampón ensayo, tal que contenga 8.000-10.000 c.p.m. por 100  $\mu$ L.

d)  $\alpha$ MT6S estándar. 500 pg de  $\alpha$ MT6S, suministradas a la concentración 200 pg/mL. El estándar en esta forma es estable durante 12 semanas a 4°C.

- e) *Orina libre de  $\alpha$ MT6S*. Es suministrada liofilizada. Se reconstituye con 25 mL de tampón para dar una dilución 1:250. Se guarda a -20°C.
- f) *Muestras de orina*. Las muestras de orina, deben ser almacenadas a -20°C.  $\alpha$ MT6S es estable durante dos años en orina, si se almacena a -20°C, y durante una semana, si se almacena a 4°C, y por lo menos 2 horas, a temperatura ambiente. Antes de realizar el ensayo, es necesario realizar la dilución 1:250 con tampón de ensayo. Se recomienda realizar las diluciones en el propio tubo de ensayo.
- g) *Controles de calidad*. Suministra tres muestras identificadas como: bajo, medio y alto. Cada una será tratada en la misma forma que las muestras e incluidas en cada ensayo diluidas 1:250. El pool bajo (n=20) da una media 3,1 ng/mL, el medio (n=20) da una media de 19,6 ng/mL y el alto (n=20) de 37,7 ng/mL en orina humana. Todos los reactivos utilizados serán almacenados a 4°C tras su recepción, y son estables por lo menos 16 semanas.

### **3.1.5.2.- Metodología**

Los tubos de ensayo llevan los siguientes volúmenes:

500  $\mu$ L de muestras / estándar

200  $\mu$ L de anticuerpo

100  $\mu$ L de  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ MT6S

100  $\mu$ L de dextran-coated charcoal

900  $\mu$ L de volumen total

Dentro del ensayo hay que preparar las siguientes variantes:

$CT$  (cuentas totales) = ----- + ----- + 100  $\mu$ L de  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ MT6S.

$B_0$  = 500  $\mu$ L de tampón de ensayo + 200  $\mu$ L de Anticuerpo + 100  $\mu$ L de  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ MT6S.

$NSB$  (unión no específica) = 500  $\mu$ L de un estándar cualquiera + 200  $\mu$ L de tampón de ensayo + 100  $\mu$ L de  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ MT6S.

### 3.1.5.3.- Protocolo de ensayo

Para preparar la curva estándar es necesario realizar las diluciones correspondientes con el estándar suministrado y la orina libre de  $\alpha$ MT6S (Tabla 7).

Tabla 7. Datos para la curva estándar

$\alpha$ MT6S estándar 200pg/mL	Orina libre de $\alpha$ MT6S 1:250 dilución	$\alpha$ MT6S pg/tubo	$\alpha$ MT6S ng/mL orina
0 $\mu$ L	500 $\mu$ L	0	0
5 $\mu$ L	495 $\mu$ L	1	0,5
10 $\mu$ L	490 $\mu$ L	2	1
20 $\mu$ L	480 $\mu$ L	4	2
40 $\mu$ L	460 $\mu$ L	8	4
70 $\mu$ L	430 $\mu$ L	14	7
100 $\mu$ L	400 $\mu$ L	20	10
200 $\mu$ L	300 $\mu$ L	40	20
500 $\mu$ L	0 $\mu$ L	100	50

La concentración final, ng/mL de orina, para cada punto de la curva, se obtiene de la siguiente forma:

Por ejemplo, para el punto de la curva:

$$5 \mu\text{L } \alpha\text{MT6S/tubo} + 495 \mu\text{L orina libre de } \alpha\text{MT6S} = 500 \mu\text{L volumen}$$

$$\begin{array}{lcl}
 200 \text{ pg } \alpha\text{MT6S estándar} & \longrightarrow & 1 \text{ mL} \\
 X & \longrightarrow & 5 \mu\text{L}
 \end{array}
 \quad X=1 \text{ pg } \alpha\text{MT6S} = 500 \mu\text{L}$$

$$\begin{array}{ccc}
 1 \text{ pg } ^\alpha\text{MT6S}/500 \text{ } \mu\text{L volumen} & \longrightarrow & 0,001 \text{ ng } ^\alpha\text{MT6S}/500 \text{ } \mu\text{L volumen} \\
 & & \downarrow \\
 & & 0,002 \text{ ng } ^\alpha\text{MT6S}/1000 \text{ } \mu\text{L volumen}
 \end{array}$$

Como había una dilución previa de 1:250 hay que multiplicar este valor por 250, con lo que realmente tendríamos:

$$0,002 \text{ ng } ^\alpha\text{MT6S} \times 250 = 0,5 \text{ ng } ^\alpha\text{MT6S}/ \text{mL}$$

Las muestras de orina fueron ensayadas, previamente al análisis final, con el fin de encontrar la dilución adecuada.

En un primer análisis, se utilizó una dilución recomendada en el método, la 1:250, que debe ajustarse a su volumen de 500  $\mu\text{L}$  con el tampón de ensayo, como los estándares (Tabla 8).

Los ensayos realizados fueron:

Tabla 8. Ensayos para elegir la dilución óptima para la cuantificación de  $^\alpha\text{MT6S}$

Vol. de orina	Dilución con el tampón de ensayo	Vol. final	Vol. utilizado para el análisis
5 $\mu\text{L}$	1/250	1250	500
10 $\mu\text{L}$	1/125	1250	500
5 $\mu\text{L}$	1/125	625	500
10 $\mu\text{L}$	1/50	500	500
20 $\mu\text{L}$	1/50	1000	500
20 $\mu\text{L}$	1/25	1500	500

Las tres primeras diluciones no entraban en la curva estándar, por defecto de concentración. Las tres últimas si entraban, pero si se tomaba un volumen de muestra de 10  $\mu\text{L}$  para hacer dilución 1:50, el volumen de tampón de ensayo requerido sería muy elevado, y en el mismo caso estaba la dilución (20  $\mu\text{L}$ ) 1:50. Por ello, la dilución elegida para el análisis fue la última, con lo que todas las muestras se prepararon directamente en el tubo de ensayo, obteniéndose así los 500  $\mu\text{L}$ .

- a) Añadir 200  $\mu\text{L}$  del Anticuerpo (AB/S/06, dilución 1:20.000) a todos los tubos excepto al AT (actividad total) y al NSB (unión no específica). Agitar e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- b) Para la preparación del  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ MT6S es necesario comprobar las cuentas por minuto (c.p.m.) existentes en 5  $\mu\text{L}$  del compuesto suministrado por el kit.

En nuestro caso: 5  $\mu\text{L}$   $\longrightarrow$  62.502,6 c.p.m.

Tras los cálculos correspondientes para realizar el ensayo de 256 tubos, se preparó una dilución de 30 mL que presentaba 7.905,6/100  $\mu\text{L}$  c.p.m. Posteriormente, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de dicha disolución a los tubos y se agita. A continuación, se incuba durante 15 minutos a 4°C.

- c) Separar la fracción de  $\alpha$ MT6S ligada al anticuerpo de la fracción libre, añadir 100  $\mu\text{L}$  de "dextran-coated charcoal", previamente agitado por 30 minutos, agitar durante la adicción. A continuación, se incuba durante 15 minutos a 4°C.
- d) Centrifugar a 3.500 r.p.m., a 4°C, durante 15 minutos.
- e) Inmediatamente tras la centrifugación, aspirar el sobrenadante.
- f) Contar los tubos para medir la fracción libre en un contador gamma calibrado para  $^{125}\text{I}$  (COBRA II. Auto-gamma).

#### **3.1.5.4.- Cálculo de los resultados**

Todas las muestras se valoraron en el mismo ensayo con el fin de evitar variaciones inter-ensayo, el coeficiente de variación intra-ensayo fue menor del 10%. Algunas muestras se analizaron por duplicado y otras por sencillo para cada grupo de estudio, teniendo en cuenta que hubiera muestras de cada uno de los deportistas, analizadas de ambas maneras. El ensayo presentó una unión máxima del 81,17% calculada al dividir  $B_0/CT$ . La sensibilidad de la curva fue de 0,5 ng/mL.

Para calcular la fracción ligada, es necesario hallar la diferencia entre las cuentas totales (CT) y la fracción libre. Igualmente, se halla la diferencia entre las cuentas totales (CT) y  $B_0$  (unión máxima), para hacer los cálculos de la unión de cada muestra y puntos de la curva. La expresión matemática utilizada fue la siguiente:

$$\frac{CT - \text{CPM (muestra/estándar)}}{CT - B_0} = \% \text{ unión (ng/mL)}$$

#### **3.1.6.- Análisis estadísticos**

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  error estándar (EEM). Para realizar los cálculos y pruebas estadísticas se utilizó una herramienta informática, el programa SPSS v.18. Para el análisis estadístico de los resultados se realizó en primer lugar el Test de Kolmogoroff- Smirnof para comprobar la normalidad de las variables, dando significativo,  $p < 0,01$ , lo que nos indica que no cumple este criterio. Por lo tanto, para las comparaciones de los valores obtenidos en los dos tiempos (mañana, noche) dentro de cada fase de entrenamiento, por tratarse de datos dependientes y las variables no cumplir la normalidad, se realizó el Test de Wilcoxon. Para las comparaciones entre los valores obtenidos en las distintas fases del entrenamiento, por tratarse de datos independientes y las variables no cumplir la normalidad se realizó el Test U de Mann-Whitney. Para estos tests el valor  $p < 0,05$  se consideró el límite de significación.

### **3.2.- Experimentación en un modelo animal**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de tres meses de edad provenientes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Los animales estaban alojados por parejas en jaulas de policarbonato de 48 x 27 x 20 cm, con libre acceso a comida (Harlam 2014) y agua. Instalados en una habitación con control automático de los ciclos de luz (12h de luz: 12h de oscuridad; las luces se encendían a las 01:00h), con temperatura  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  y humedad relativa del 55-60%. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo. Y siguió los principios éticos de investigación y docencia con animales, definidos internacionalmente (Institute of Laboratory Animal Resources) y aceptados por la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL).

Utilizando un modelo animal se realizó la cuantificación de la actividad citrato sintasa en tejidos y la concentración de citrato presente en orina. Así como la determinación de otros parámetros bioquímicos, como son el hematocrito, proteínas plasmáticas totales, la osmolaridad plasmática y urinaria. Además, se ha medido la actividad neuronal, por métodos inmunohistoquímicos estudiando la activación del gen c-fos, en regiones hipotalámicas implicadas en la regulación del balance hídrico y el estrés.

### 3.2.1.- Protocolo de ejercicio

Las ratas fueron divididas en tres grupos: a) controles (n= 13), b) sacrificadas 1 hora tras el ejercicio (n= 13) y c) sacrificadas 24 horas tras el ejercicio (n= 13). El entrenamiento físico fue realizado en una rueda motorizada (Braun Melgusen) que permitía controlar la velocidad a la que se realizaba el ejercicio. Se aplicaron 4 tests de ejercicio en total, una prueba al día, en 4 días sucesivos, de acuerdo al siguiente protocolo experimental en el que se muestra el tiempo invertido en cada velocidad (Tabla 9):

Tabla 9. Pruebas de ejercicio, su duración y velocidad

Día	Ejercicio (min)	Velocidad (m/min)	Duración del ejercicio diario (min)
1°	5	6,6	20
	10	9,6	
	5	13,2	
2°	5	6,6	25
	10	9,6	
	10	13,2	
3°	5	6,6	30
	10	9,6	
	10	13,2	
	5	15,4	
4°	5	6,6	30
	10	9,6	
	10	13,2	
	5	15,4	

Teniendo en cuenta que la rata es un animal de actividad nocturna, el entrenamiento se realizó al final del periodo de luz, cuando puede responder más activamente a la prueba de ejercicio.

A lo largo de todo el proceso de entrenamiento los animales se encontraban individualizados en jaulas metabólicas. De forma que se controló de forma individual su ingesta de agua y alimento diaria, así como sus variaciones de peso.



### **3.2.2.- Recogida de muestras**

#### **3.2.2.1.- Recogida de muestras de orina**

Las ratas permanecieron individualizadas en jaulas metabólicas durante 24 horas, permitiendo así realizar la recogida de muestras de orina para la posterior determinación de citrato (Figura 12). En las ratas controles se aplicó el mismo procedimiento.

Para la recogida de muestras de orina se utilizó un colector de fracciones, Spectra Krom, que nos permitió recoger las muestras de 24 horas en 6 fracciones, de 4 horas cada una. La recogida se realizó en las ratas control y antes del inicio de los test (o pruebas), pre-test, son por tanto 6 muestras de cada rata. Además tras la realización del último test, el 4º del programa de entrenamiento, se recogieron de nuevo las orinas de 24 horas. Éstas son las muestras de orina post-test, que son otras 6 muestras por cada rata. Los volúmenes de orina fueron medidos y almacenados a -20°C para una posterior determinación de citrato, siguiendo el mismo protocolo que el descrito para humanos.

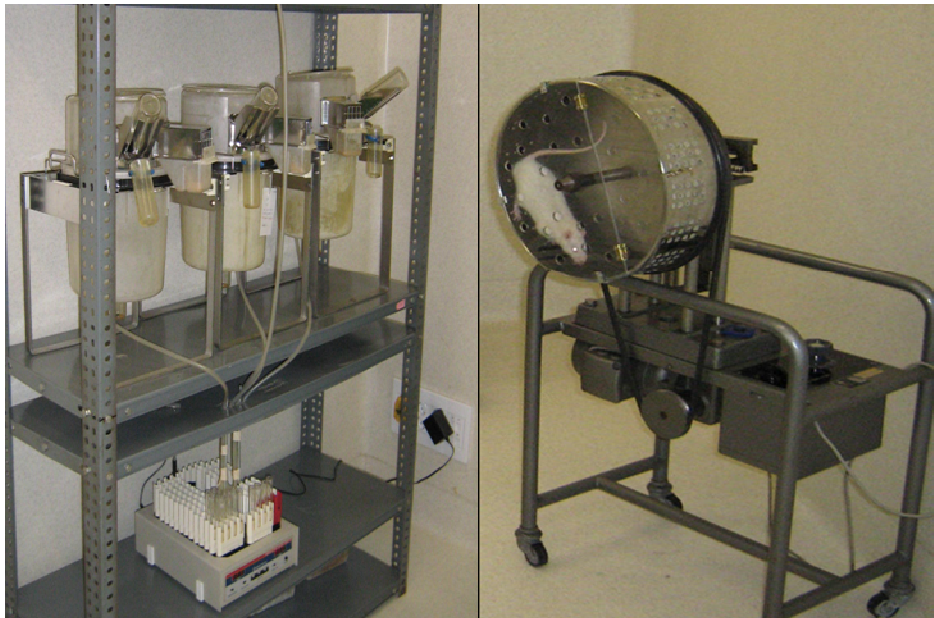


Figura 12. Fotografía del sistema de recogida de muestras, y de uno de los animales, durante su entrenamiento en la rueda motorizada (Braun Melgusen).

### 3.2.2.2.- Recogida de muestras de tejido

Una vez finalizado el entrenamiento (tras la prueba 4ª) los animales fueron sacrificados (un grupo tras 1 hora, otro a las 24 horas) y se obtuvieron muestras de hígado, sangre y músculo (sóleo y gastrocnemio). La Tabla 10 resume el protocolo de entrenamiento y la recogida de muestras de tejido. Del grupo de ratas control se recogieron muestras de los mismos tejidos. Los tejidos fueron pesados y preparados para el posterior procesamiento y aislamiento mitocondrial.

Tabla 10. Esquema del protocolo de entrenamiento

Prueba/Día	1°	2°	3°	4°			
Duración del entrenamiento	20´	25´	30´	30´			
Rata	Hora de inicio del ejercicio para cada rata						
<b>1</b>	JM	10.00	9.45	9.30	9.30	JM	Sacrificar
<b>2</b>	JM	10.20	10.10	10.00	10.00	JM	Sacrificar
<b>3</b>	JM	10.40	10.35	10.30	10.30	Tras 1 hora	Sacrificar
<b>4</b>	JM	11.10	11.00	11.00	11.00	Tras 1 hora	Sacrificar

Esquema del protocolo de entrenamiento indicando las horas de inicio del entrenamiento en cada prueba y para cada rata, los días de sacrificio y de recogida de muestras. Cuatro ratas por grupo. JM= Las ratas permanecen en jaulas metabólicas durante 24 horas.

### **3.2.3.- Determinación de hematocrito, proteínas totales y osmolaridad**

Para la determinación del hematocrito por capilaridad se utilizaron tubos capilares de vidrio. Las muestras se colocaron en una centrifuga de microhematocrito Centrolit II (P-Selecta) durante 5 minutos a 12.000 r.p.m. Los valores obtenidos se expresan como porcentaje del volumen total formado por glóbulos rojos.

Las muestras de sangre almacenadas fueron centrifugadas a 4°C (centrifuga Jouan BR3.11), durante 5 minutos a 3.000 r.p.m. Los plasmas fueron aspirados, recogidos individualmente y almacenados a 4°C.

Para cuantificar las proteínas totales en plasma se utilizó un refractómetro (Atago SPR-T2). El volumen de cada muestra fue de 10 µlitros. El refractómetro funciona concentrando un rayo de luz a través de una muestra líquida. Este instrumento mide la cantidad de luz que es reflejada (o desviada) de la trayectoria original debido a los componentes de la muestra. En la sangre, las proteínas pueden causar que la luz sea desviada. A mayor cantidad de proteína, mayor es la cantidad de luz que es desviada de su trayectoria original (Hayes y cols., 2000).

La osmolaridad plasmática y urinaria fueron medidas con un osmómetro (Wescor 5500). El volumen de cada muestra fue de 10 µlitros. El osmómetro es una adaptación electrónica avanzada del método higrométrico de determinación de la presión de vapor. La presión de vapor y el punto de congelación están entre las propiedades coligativas de una solución. En comparación con el disolvente puro, estas propiedades se ven alteradas en proporción al número de partículas de soluto disueltas en cada kilogramo de disolvente (agua en el caso de soluciones biológicas). Así, la medición de una de las propiedades es un medio indirecto de determinación de la concentración de la solución u osmolalidad (Pensyl y Benjamin, 1999).

### **3.2.4.- Aislamiento mitocondrial**

Las mitocondrias fueron extraídas de tejidos animales por un método de homogeneización descrito por Storrie y Madden, (1990), y Graham, (1993), utilizando el kit de aislamiento mitocondrial, MITOISO1 (Sigma- Aldrich) y un homogeneizador, politrón Aggregat PT-DA (Kinematika AG, Dioperger-und Mishtechnik). El proceso de homogenización requiere varias centrifugaciones, una de baja (600x g) y otra de alta (11.000x g) velocidad. Se realizaron en una centrífuga refrigerada Neurofuge 23R. El precipitado mitocondrial puede ser suspendido en tampón de almacenamiento. Todo el proceso debe ocurrir a 4°C.

#### **3.2.4.1.- Reactivos**

- a) *Tampón de extracción A 1x*: HEPES (ácido n-2-nidroxietilpiperacín-n'-2 etanosulfónico) 50 mM, pH 7,5, manitol 1 M, sacarosa 350 mM y EGTA 5 mM (ácido tetra-acético del glicol de etileno).

Descongelar el tampón A a 37°C durante 15 segundos en un horno microondas. Diluir una alícuota del tampón cinco veces con agua destilada. Mantener la dilución a 4°C hasta su uso. El concentrado puede ser congelado.

- b) *Tampón de extracción B 1x*: MOPS (sal sódica del ácido 3-n-morfolino propanosulfónico), KCl (cloruro potásico) 550 mM y EGTA 5mM.

Diluir una alícuota de tampón B cinco veces en agua destilada. Mantener la dilución a 4°C hasta su uso. El concentrado puede ser recongelado.

- c) *Tampón de almacenamiento 1x*: HEPES 50 mM, pH 7,5, sacarosa 1,25 M, ATP 5 mM, 0,4 mM ADP, succinato sódico 25 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato potásico) 10 mM y DTT (1,4- ditioltreitol) 5 mM.

Diluir una alícuota del tampón en cinco partes de agua destilada. Mantener la dilución a 4°C antes de usarla. El concentrado puede ser recongelado.

- d) *Solución de albúmina (50 mg/mL)*: Diluir en el tampón apropiado (A, tejidos “blandos”; B, tejidos “duros”).

- e) *Tripsina*: Diluir una alícuota de tripsina en el tampón de extracción B a 25 mg/mL. Mantener a 4°C.

### **3.2.4.2.- Fundamento del ensayo**

Las mitocondrias pueden ser extraídas fácilmente de tejidos animales por un sencillo método de homogeneización seguido de centrifugaciones, una centrifugación de baja (600x g) y otra de alta (11.000x g) velocidad. El precipitado final representa la fracción mitocondrial “bruta”, que puede ser utilizada como base para la mayoría de los experimentos en mitocondria. El kit que se utilizó en estos experimentos contiene los reactivos necesarios para aislamiento mitocondrial tanto a partir de tejidos “blandos”, cerebro e hígado, como de tejidos “duros”, músculo esquelético o cardíaco.

Los tejidos “blandos” son extraídos en presencia de albúmina de suero bovino, que elimina los ácidos grasos libres presentes en el tejido (que podrían provocar el desacoplamiento de la cadena respiratoria en la mitocondria) y EGTA, que “secuestra” los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  evitando el “hinchamiento” mitocondrial.

En los tejidos “duros” no se puede homogeneizar tan fácilmente sin un pretratamiento con una proteasa como la tripsina, que facilita la rotura o quiebre de la estructura celular. Las miofibrillas del músculo esquelético tienden a dar una consistencia gelatinosa al homogeneizado en un medio no iónico (isotónico glucosilado) y por lo tanto debe ser aislado en un medio isotónico como es el tampón de extracción B.

### **3.2.4.3.- Protocolo del ensayo**

#### *a) Preparación de las mitocondrias a partir de tejidos “blandos” (hígado)*

1. Utilizar una muestra de tejido fresco (cuando no ha transcurrido una hora desde el sacrificio), mantener en frío. No congelar.
2. Lavar la muestra dos veces con 2 volúmenes de tampón de extracción A 1x.
3. Cortar en pequeñas porciones el tejido (100 mg) y pesarlo en un microtubo.
4. Cortar el tejido en porciones más pequeñas con ayuda de unas tijeras.
5. Homogeneizar la muestra con 10 volúmenes de tampón A 1x que contengan 2 mg/mL de albúmina (utilizando la solución de albúmina). Utilizando un homogeneizador de 3 mL con una potencia de 200 r.p.m. Para asegurar la homogenización total de la muestra mover el “mortero” 5-10 veces. Mantener el homogeneizado en hielo.
6. Traspasar el homogeneizado a un microtubo de 2 mL y centrifugar la muestra a 600 x g durante 5 minutos.
7. Con cuidado pasar el líquido sobrenadante a un nuevo microtubo. Centrifugarlo a 11.000 x g durante 10 minutos.
8. Sacar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 10 volúmenes de tampón de extracción A (1x).
9. Repetir los pasos 6 y 7.
10. Suspender el precipitado en tampón de almacenamiento 1x (aprox. 40 µL por 100 mg de tejido).
11. Esta muestra puede ser ahora utilizada para medir la concentración de citrato sintasa.

*b) Preparación de las mitocondrias a partir de tejidos “duros” (músculo)*

1. Utilizar una muestra de tejido fresco (cuando no ha transcurrido una hora desde el sacrificio), mantener en frío. No congelar.
2. Lavar la muestra dos veces con 2 volúmenes de tampón de extracción B1x.
3. Cortar en pequeñas porciones el tejido (100 mg) y pesarlo en un microtubo.
4. Cortar el tejido en porciones más pequeñas con ayuda de unas tijeras.
5. Suspendir la muestra con 10 volúmenes del tampón de extracción B1x que contenga 0,25 mg/mL de tripsina en un microtubo de 2 mL.
6. Incubar en hielo durante 3 min. Y luego centrifugar el tejido durante unos minutos.
7. Quitar el sobrenadante aspirándolo y añadir 8 volúmenes del tampón B1x y que contiene los 0,25 mg/mL de tripsina.
8. Incubar en hielo durante 20 minutos.
9. Añadir la solución de albúmina hasta que su concentración final sea de 10 mg/ml para parar la reacción proteolítica, mezclar y luego centrifugar unos minutos el tejido.
10. Quitar el sobrenadante aspirándolo y añadir 8 volúmenes del tampón apropiado y centrifugar unos minutos.
11. Quitar el sobrenadante aspirándolo y añadir 8 volúmenes del tampón apropiado.
12. Homogeneizar utilizando un sonicador de 3 mL con una potencia de 200 r.p.m. Para asegurar la homogeneización subir y bajar el “mortero” 20-30 veces.
13. Centrifugar la muestra a 600 x g durante 5 minutos.
14. Con cuidado pasar el líquido sobrenadante a un nuevo tubo. Centrifugarlo a 11.000 x g durante 10 minutos.
15. Suspendir el precipitado en el tampón de mantenimiento 1x (aprox. 40 µL por 100 mg de tejido).
16. Esta muestra puede ser ahora utilizada para medir la concentración de citrato sintasa.

### **3.2.5.- Determinación de la actividad citrato sintasa**

Se utilizó el kit (Sigma-Aldrich) para la determinación de la actividad citrato sintasa. La citrato sintasa (CS) es el enzima inicial del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). El enzima cataliza la reacción entre el aceti CoA y el ácido oxalacético para formar ácido cítrico. Este enzima es un marcador exclusivo de la matriz mitocondrial (Trounce y cols., 1996; Graham y Rickwood, 1997).

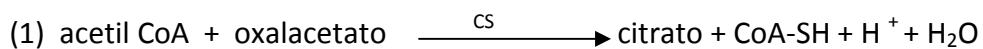
#### **3.2.5.1.- Reactivos**

- a) *Tampón de ensayo para la actividad citrato sintasa 1x*: Descongelar el tampón 5x y mezclar hasta obtener el homogeneizado. Diluir una alícuota de tampón 5 veces con agua destilada. El tampón 5x y el 1x pueden ser almacenados a 4°C hasta 6 meses.
  - b) *Solución de acetil CoA (30 mM)*: Disolver el contenido del vial con 1 mL de agua destilada y mezclar con cuidado hasta formar el homogeneizado. Para almacenamiento a largo plazo, preparar alícuotas y conservarlas a -20°C.
  - c) *Solución de Oxalacetato (OAA; 10 mM)*: Almacenar el liofilizado a -20°C. Antes de usarlo, disolver 1.3 mg en 1 mL de tampón citrato sintasa. Mezclar hasta obtener el homogeneizado. El 10 mM de solución de oxalacetato puede ser almacenado a -20°C hasta una semana.
  - d) *Ácido Ditionitrobenzoico (DTNB; 10 mM )*: Disolver el contenido de un vial en 1 mL de etanol absoluto. Mezclar hasta obtener el homogeneizado. Para el almacenamiento a largo plazo, preparar alícuotas y conservarlas a -20°C.
  - e) *Solución de citrato sintasa (control positivo)*: La actividad del control de la actividad citrato sintasa que viene en el kit es de 2-16 unidades. Descongelar la solución enzimática y ponerla en alícuotas. La enzima puede ser almacenada a 4°C hasta una semana. Para almacenamiento a largo plazo, almacenar a -20°C.
- Para cada set de reacciones, diluir una alícuota 10 veces con tampón para la citrato sintasa y luego usar de 5-10 µlitros para cada control positivo. Usar la solución de control diluida inmediatamente y no almacenar ningún remanente.

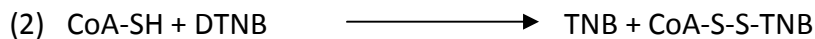


### 3.2.5.2.- Fundamento de ensayo

El enzima citrato sintasa cataliza la reacción entre la acetil coenzima A (acetil CoA) y el ácido oxalacético (OAA) para formar citrato. El acetil CoA contribuye con 2 carbonos y junto a los 4 del oxalacetato da como resultado el citrato de 6 carbonos. La hidrólisis del tioester de acetil CoA resulta en la formación de CoA con el grupo tiol (CoA-SH) (1).



El tiol reacciona con el DTNB en la reacción de mezcla para formar ácido 5-tio-2- nitrobenzoico (TNB) (2).



Este producto amarillo (TNB) puede cuantificarse espectrofotométricamente a través de la absorbancia a 412 nm (Srere, 1969).

### 3.2.5.3.- Protocolo del ensayo

Para la detección de la actividad citrato sintasa, el precipitado mitocondrial fue suspendido en tampón bicina. Se dividió la suspensión en dos tubos y se centrifugó a 11.000x g durante 10 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el primer tubo con CelLytic (200 µL/g de muestra) y en el segundo con tampón bicina (200 µL/g de muestra). La actividad observada en la muestra suspendida en el reactivo de CelLytic representa la actividad citrato sintasa total presente en la mitocondria, donde la mitocondria de la muestra está rota y el sustrato de la mezcla está fácilmente disponible para la enzima. La actividad citrato sintasa observada en la suspensión de tampón bicina representa la actividad resultante de las mitocondrias (íntegras o rotas por un proceso mecánico) obtenidas en la preparación de mitocondrias aisladas. Se utiliza el lector de placas Thermo Spectronic,

Model hélice Epsilon para placas de 96 pocillos, donde se mide la absorbancia de las preparaciones, a 412 nm para la valoración de la actividad endógena. Al minuto y medio se añade a las muestras el oxalacetato, y se mide de nuevo la absorbancia de las muestras a 412 nm para la valoración de la actividad total.

Tabla 11. Resumen de reactivos para la determinación de la actividad CS.

Reactivos	Muestra	1x Tampón de ensayo	Solución de acetil CoA (30mM)	Solución de DTNB (10mM)	Solución de OAA(10mM)
Muestra CellLyctic	8 µL	178 µL	2µL	2µL	10µL
Muestra tampón bicina	8 µL	178 µL	2µL	2µL	10µL
Citrato sintasa (control positivo)	8 µL	184 µL	2µL	2µL	10µL

### 3.2.5.4.- Cálculo de resultados

Para el cálculo de resultados se midió la absorbancia (A 412) primero para la actividad endógena, y después de añadir el OAA, para la actividad total. Se resta la absorbancia de la actividad endógena de la total y nos dará un valor,  $\Delta A$  (412), que representará la absorbancia resultado de la actividad citrato sintasa en la muestra. Se calcula la actividad neta de citrato sintasa utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{unidades (mmol/mL/min)} = \frac{\Delta A (412) / \text{min} \times V(\text{mL})}{\epsilon \times L (\text{cm})}$$

V = volumen final (0,2 mL)

$\epsilon$  = coeficiente de extinción de NADH a 412 nm: 613, 6 (L x 1/mmol x 1/cm)

L = longitud de la cubeta (0,552 cm)

### **3.2.5.5.- Determinación de la membrana mitocondrial interna intacta**

La relación entre la actividad citrato sintasa de las preparaciones mitocondriales con tampón bicina frente a la misma actividad pero en las mitocondrias tratadas con el reactivo de lisis CellLytic, proporcionan el porcentaje de mitocondrias rotas.

$$\% \text{ Mitocondrias rotas} = \frac{\text{actividad bicina}}{\text{actividad CellLytic}} \times 100$$

### **3.2.6.- Determinación de la actividad neuronal**

#### **3.2.6.1.- Perfusión**

Nueve de las ratas Wistar macho fueron divididas en tres grupos: control (n= 3), sacrificados tras 1 hora (n= 3) y tras 24 horas (n= 3) desde el final de la ejecución del último ejercicio (Post-test4). El protocolo de entrenamiento al que fueron sometidas es el anteriormente descrito.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (150 mg/kg). Una vez anestesiados fueron perfundidos intracardialmente con 200 mL de PBS (tampón fosfato 0,01 M) y a continuación con 200 mL de solución fijadora PF (tampón paraformaldehído fosfato 0,16 M). Posteriormente se les extrajo el cerebro y se mantuvo 24 horas en la solución fijadora PF, al cabo de las cuales fue colocado en una solución para su conservación, compuesta por PBS con sacarosa al 30%. Los cerebros se mantuvieron a 4°C hasta que fueron seccionados.

### **3.2.6.2.- Fundamento de ensayo: Inmunohistoquímica**

Se realizaron secciones seriadas coronales (40  $\mu\text{m}$ ) de los cerebros, usando un criotomo (Leica CM1900).

Para analizar la inmunorreactividad c-fos se hizo un ensayo inmunohistoquímico ABC (por "free floating") para el que se utilizó el kit Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratorios, Burlingame, CA).

Se utilizó un método indirecto, del anticuerpo no marcado o de puente, en concreto el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC). El método inmunohistoquímico ABC es el más utilizado ya que tiene una alta sensibilidad (Hsu y cols., 1981). Requiere la preparación 'in vitro' del complejo avidina-biotina-peroxidasa dejando al menos uno de los cuatro lugares de unión de la superficie de la avidina libre para que se una a las moléculas de avidina unidas con el anticuerpo (primario o secundario). El complejo se añade después del anticuerpo biotinilado. La tercera capa es siempre la misma independientemente de la especie en que se haya obtenido el primario.

El cromógeno más popular de la actividad peroxidásica es el tetracloruro de diaminobenzidina (DAB). En esta reacción el agua oxigenada actúa como un sustrato enzimático y el DAB es el donante de electrones. Como resultado el DAB se oxida y forma un precipitado coloreado marrón e insoluble. Existen métodos para incrementar la señal obtenida con el DAB como por ejemplo añadir metales. Este proceso se puede hacer antes, durante o después de la reacción de revelado. La adición de sales de zinc incrementa la intensidad de la reacción pero no varía la coloración del DAB. El cloruro de cobalto se emplea inmediatamente antes de la incubación con DAB. Intensifica la reacción y cambia el color del precipitado a marrón oscuro (Graham y Karnovsky, 1966).

### **3.2.6.3.- Protocolo del ensayo para c-fos**

1. Sumergir cada serie de 7 cortes en una solución bloqueadora de la actividad peroxidasa endógena (PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, metanol) de 20 a 40 minutos.
2. Lavar tres veces con PBS frío.
3. Para bloquear las proteínas no específicas y evitar que el anticuerpo primario se una a ellas, sumergir los cortes en solución de PBS y suero de cabra, de 20 a 40 minutos.
4. Lavar tres veces con PBS frío.
5. Añadir el anticuerpo primario (1: 2,000 Anti-c-Fos: PBS + 0.3% Triton X). Permaneciendo sumergidas en esta solución y a temperatura ambiente toda la noche.
6. Lavar tres veces con PBS frío.
7. Incubar los cortes cerebrales con el anticuerpo secundario (1: 200 Anti-conejo IgG: PBS + 0.3% Tritón X) durante 1 hora.
8. Repetir el lavado de los cortes tres veces con PBS.
9. Sumergir en la solución del Complejo AB (avidina-biotina) durante una hora. Lavar los cortes tres veces en PBS.
10. Después sumergir los cortes en una solución de diaminobenzidina (DAB), PBS, 0,5% CoCl<sub>2</sub>, 0,5% NiCl<sub>2</sub>, 3,0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre unos 7-9 minutos.
11. Lavar tres veces en PBS.
12. Finalmente montar los cortes en portas de cristal, secar al aire y posteriormente deshidratar a través de su paso por una serie de soluciones de etanol (60-100%), disolver los lípidos con xileno.

### **3.2.6.4.- Análisis de datos**

Los cortes cerebrales fueron examinados con un microscopio y comparados con fotografías de secciones idénticas del atlas estereotáxico de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1986). Usando la cámara del microscopio óptico Nikon Eclipse e400 con un objetivo de 4x, se fotografiaron las zonas que mostraban un mayor número de núcleos activados. En estas zonas se cuantificó la actividad c-fos utilizando el programa

de análisis de gráficos Leica Qwin vs. 3.0 del Servicio de Análisis de Imagen de la Universidad de Oviedo.

### **3.2.7.- Análisis estadístico**

Todos los datos se expresan como valor medio  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Para realizar los cálculos y pruebas estadísticas se utilizó una herramienta informática, el programa SPSS versión 18.

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó en primer lugar el Test de Kolmogoroff-Smirnoff para comprobar la normalidad de las variables. Todas las variables estudiadas cumplen la distribución normal, dando valores estadísticos no significativos,  $p > 0,01$ .

Para analizar las diferencias dentro de cada variable, variables con muestras control, 1H y 24H, se utilizó el test ANOVA de una vía, con la prueba post-hoc Test de Duncan.

Para el estudio de los valores de las variables ingesta sólida, líquida y pesos corporales, a lo largo del programa de entrenamiento, para cada una de ellas, se realizó el test ANOVA de una vía de medidas repetidas, con la prueba post-hoc Test de Duncan.

Se analizaron las diferencias entre los valores de los diferentes periodos de las variables citrato y osmolaridad urinaria de diferentes, utilizando el test ANOVA de una vía de medidas repetidas, con la prueba post-hoc Test de Duncan.

El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .







## **RESULTADOS**





## 4.1.- Resultados en deportistas

### 4.1.1.- Cuantificación de 6-sulfatoximelatonina en nadadores

La valoración conjunta de los niveles de 6-sulfatoximelatonina ( $\alpha$ MT6S) en orina, de los 12 nadadores en las distintas fases de la temporada de entrenamientos, se muestra en las Figuras 13 y 14. Al no haberse encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos sexos, los datos representados corresponden al total de la muestra.

- *Valores de 6-sulfatoximelatonina en la noche y la mañana*

Dentro de los valores nocturnos (Figura 13.A), la fase del Entrenamiento básico muestra al comienzo de la noche diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) de la concentración de  $\alpha$ MT6S con las fases de Inicio de la temporada, Descanso activo y Macro ciclo II.

En todas las fases de la temporada de entrenamiento los valores en la mañana (Figura 13.B) son significativamente más altos ( $p < 0,01$ ) que al final del día (Figura 13.A). Respecto a los valores de la mañana, coincidiendo con las mayores concentraciones obtenidas en el Macro ciclo II, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de esta fase respecto al Inicio de temporada y al Macro ciclo I (Figura 13.B).

- *Valor total e incremento nocturno de 6-sulfatoximelatonina*

La Figura 14.A describe la excreción total de  $\alpha$ MT6S (noche más mañana) en los nadadores durante el programa de entrenamiento, siendo en el Macro ciclo II donde las concentraciones de  $\alpha$ MT6S mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con el Inicio de temporada, el Entrenamiento básico y el Macro ciclo I. En la fase del Descanso activo, las concentraciones de  $\alpha$ MT6S muestran un valor intermedio con las demás fases del entrenamiento, no apareciendo diferencias significativas con éstas.

La Figura 14.B muestra el incremento de la producción nocturna de  $\alpha$ MT6S en los nadadores, obtenida como la diferencia de los valores mañana menos noche, siendo los valores en el Macro ciclo II significativamente elevados ( $p < 0,01$ ) frente a las demás fases estudiadas, Inicio de temporada, Entrenamiento básico, Macro ciclo I y Descanso activo.

#### 4.1.2.- Cuantificación de 6-sulfatoximelatonina en piragüistas

La valoración conjunta de los niveles de 6-sulfatoximelatonina ( $\alpha$ MT6S) en orina de los 10 piragüistas en las distintas fases de la temporada de entrenamientos se muestra en las Figuras 15 y 16.

- *Valores de 6-sulfatoximelatonina en la noche y la mañana*

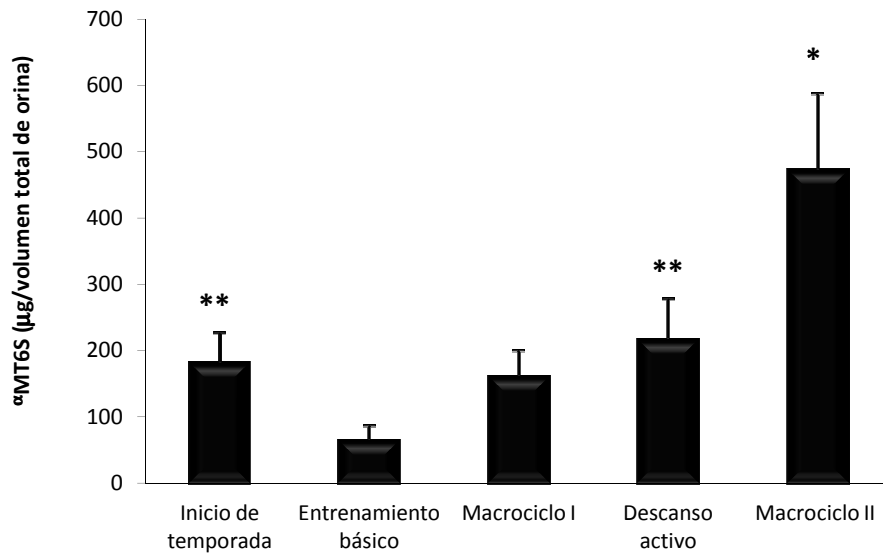
No hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de  $\alpha$ MT6S al comienzo de la noche (Figura 15.A). En las tres fases del entrenamiento los valores de  $\alpha$ MT6S, son significativamente mayores en la mañana ( $p < 0,01$ ; Figura 15.B) que al comienzo de la noche. Comparando los valores de la mañana, se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre el Descanso activo y el Macro ciclo con el Inicio de la temporada.

- *Valor total e incremento nocturno de 6-sulfatoximelatonina*

La Figura 16.A describe la excreción total de  $\alpha$ MT6S (noche más mañana) en los piragüistas, siendo en el Descanso activo y en el Macro ciclo las concentraciones de  $\alpha$ MT6S significativamente menores ( $p < 0,05$ ) a las del Inicio de temporada.

La Figura 16.B muestra el incremento de la excreción nocturna de  $\alpha$ MT6S en los piragüistas, obtenida como la diferencia de los valores de la mañana y la noche. Los valores en el Descanso activo y el Macro ciclo son significativamente menores ( $p < 0,05$ ) a los obtenidos en el Inicio de temporada.

## A) Noche



## B) Mañana

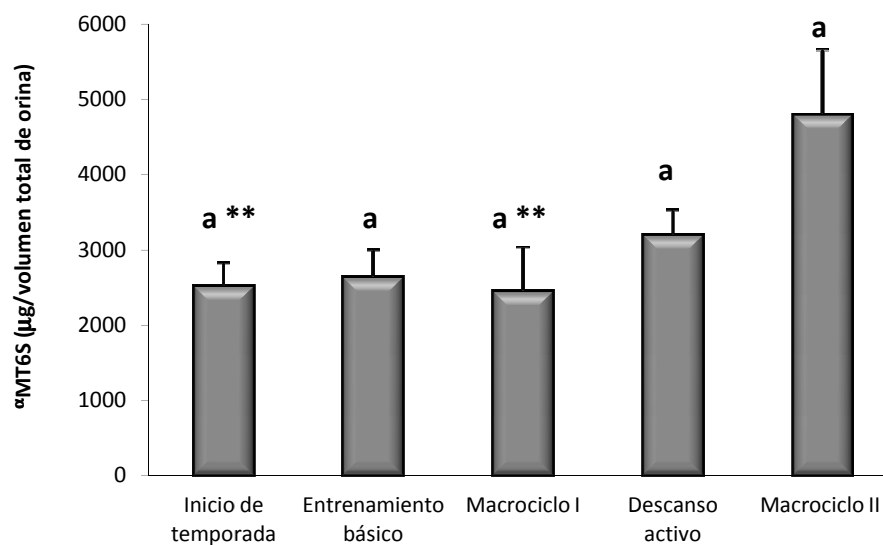
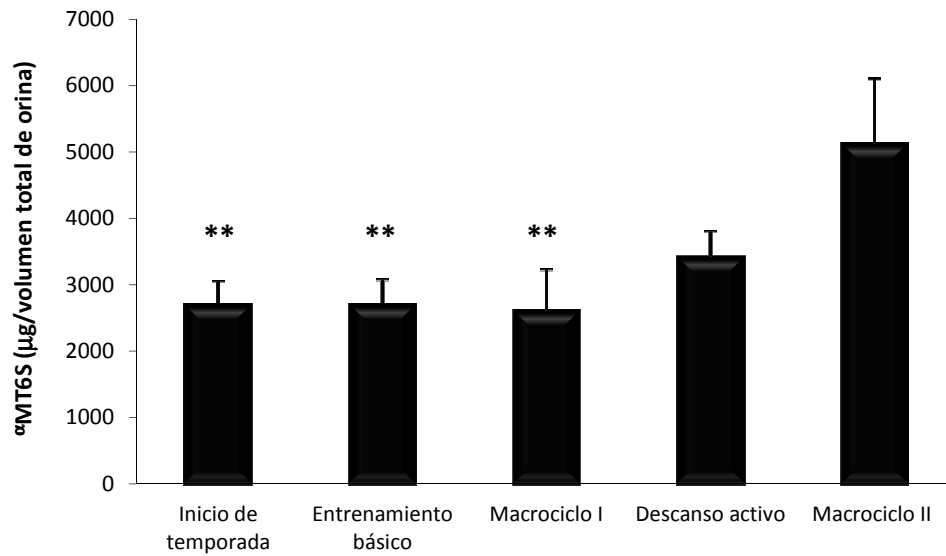


Figura 13. Valores de 6-sulfatoximeteltonina ( $\alpha$ MT6S,  $\mu\text{g/volumen total de orina}$ ) de nadadores recogida antes de acostarse (noche) y tras levantarse (mañana) a lo largo de diferentes fases del entrenamiento. Inicio de temporada ( $n = 12$ ), Entrenamiento básico ( $n = 10$ ), Macro ciclo I ( $n = 10$ ), Descanso activo ( $n = 12$ ) y Macro ciclo II ( $n = 12$ ). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones de la mañana vs. noche en cada fase, a:  $p < 0,01$ . Valores de la noche, \* $p < 0,01$  y \*\* $p < 0,05$  vs. Entrenamiento básico. Valores de la mañana, \*\* $p < 0,05$  vs. Macro ciclo II.

A)  $\alpha$ MT6S Total



B) Incremento nocturno de  $\alpha$ MT6S

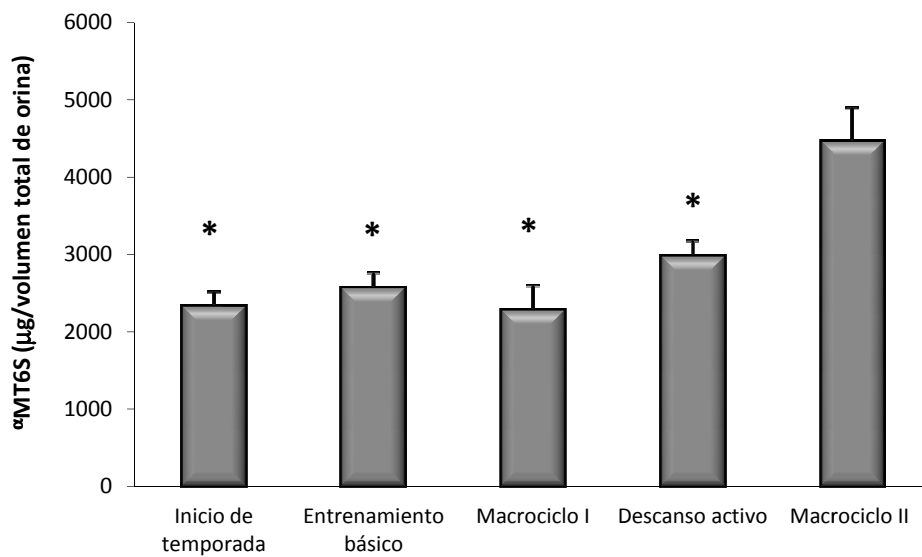
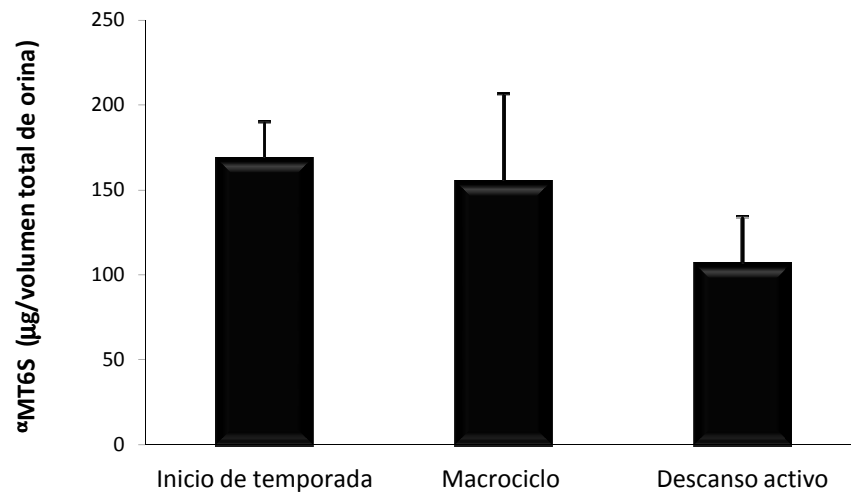


Figura 14. Valores de  $\alpha$ MT6S ( $\mu\text{g/volumen total de orina}$ ) de nadadores en las distintas fases del entrenamiento. Inicio de temporada (n= 12), Entrenamiento básico (n= 10), Macro ciclo I (n= 10), Descanso activo (n= 12) y Macro ciclo II (n= 12). Valores: media  $\pm$  EEM. A:  $\alpha$ MT6S total, suma de los valores noche más mañana. \*\*p< 0,05 vs. Macro ciclo II. B: Incremento nocturno de  $\alpha$ MT6S, diferencia de los valores mañana menos noche. \*p< 0,01 vs. Macro ciclo II.



## A) Noche



## B) Mañana

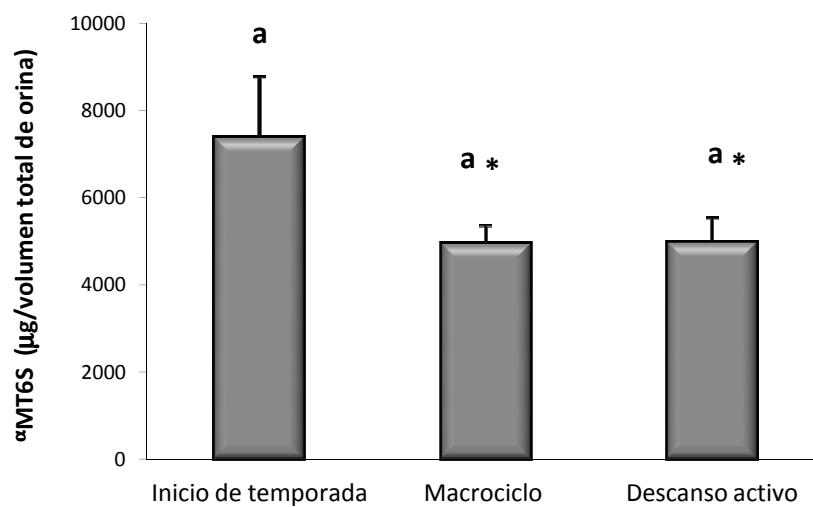
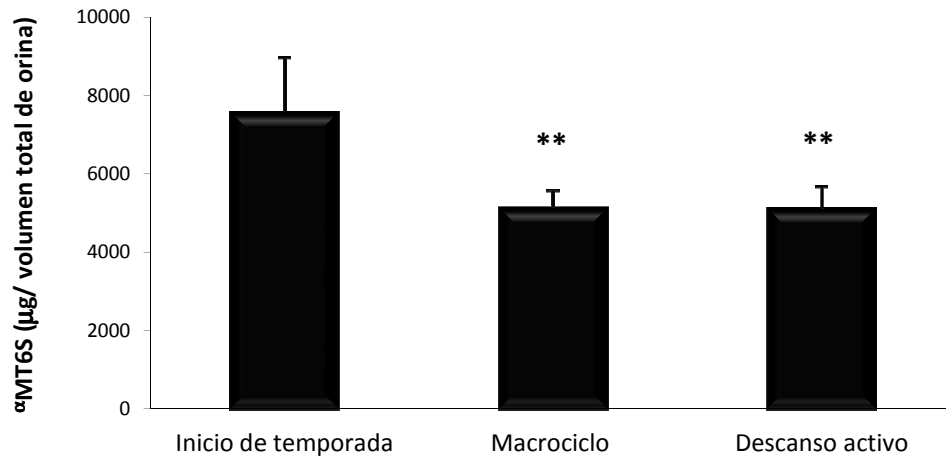


Figura 15. Valores de 6-sulfatoximelatonina ( $\alpha$ MT6S,  $\mu\text{g}/\text{volumen total de orina}$ ) de piragüistas recogida antes de acostarse (noche) y tras levantarse (mañana) a lo largo de diferentes fases del entrenamiento. Inicio de temporada (n= 10), Descanso activo (n= 10) y Macro ciclo (n= 9). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones de la mañana vs. noche en cada fase, a:  $p < 0,01$ ; valores de la mañana, \* $p < 0,01$  vs. Inicio de temporada.

A)  $\alpha$ MT6S Total



B) Incremento nocturno de  $\alpha$ MT6S

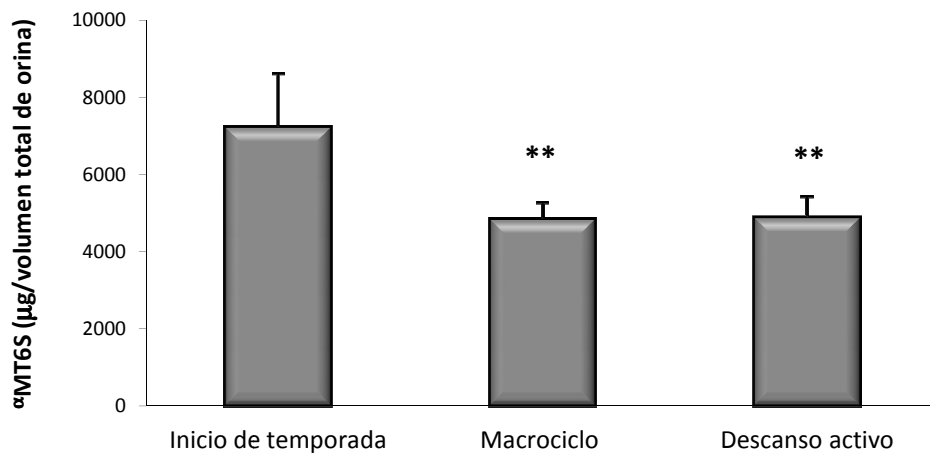


Figura 16. Valores de 6-sulfatoximelatonina ( $\alpha$ MT6S, µg/volumen total de orina) de piragüistas en las distintas fases del entrenamiento. Inicio de temporada (n= 10), Descanso activo (n= 10) y Macro ciclo (n= 9). Valores: media  $\pm$  EEM. A:  $\alpha$ MT6S total, suma de los valores noche más mañana. \*\*p< 0,05 vs. Inicio de temporada. B: Incremento nocturno de  $\alpha$ MT6S, diferencia de los valores mañana menos noche. \*\*p< 0,05 vs. Inicio de temporada.

#### 4.1.3.- Cuantificación de citrato urinario en nadadores

La valoración conjunta de los niveles de citrato en orina, de los 12 nadadores en las distintas fases de la temporada de entrenamientos, se muestra en las Figuras 17 y 18. Al no haberse encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos sexos, los datos representados corresponden al total de la muestra.

- *Valores de citrato urinario en la noche y la mañana*

La Figura 17 representa los valores de citrato (mg/L) antes de acostarse, 22:00-22:30h (noche), y al levantarse, 8:00-8:30h (mañana), en las distintas fases del entrenamiento. Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) de la mañana respecto a la noche durante el Entrenamiento básico y Descanso absoluto. En las concentraciones urinarias de citrato de la noche (momento previo al descanso nocturno) los valores de citrato no muestran ninguna diferencia estadísticamente significativa, independientemente de la carga de entrenamiento a la que hayan sido sometidos los nadadores. Sin embargo, para los valores de la mañana hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre el Descanso absoluto y el Inicio de temporada.

- *Valor total e incremento nocturno de citrato*

La Figura 18.A muestra el citrato total, es decir, la suma de la excreción de citrato (mg/L) en orina, noche más mañana. Hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre el Macro ciclo I y el Inicio de Temporada, determinados por una menor producción de citrato tanto en la mañana como en la noche del Macro ciclo I.

La Figura 18.B muestra el incremento nocturno de citrato (mg/L), que presenta un valor negativo, resultado de la diferencia mañana menos noche (mg/L). El Entrenamiento básico y el Descanso absoluto muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) respecto al Inicio de temporada.

#### 4.1.4.- Cuantificación de citrato urinario en piragüistas

La valoración de los niveles de citrato en orina de los 10 piragüistas en las distintas fases de la temporada de entrenamientos se muestra en las Figuras 19 y 20.

- *Valores de citrato urinario en la noche y la mañana*

Los valores de citrato (mg/L) antes de acostarse, 22:00-22:30h (noche), y al levantarse, 8:00-8:30h (mañana), en las fases del entrenamiento Inicio de temporada, Macro ciclo y Descanso activo aparecen representados en la Figura 19. Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la mañana respecto a la noche durante el Inicio de temporada y el Descanso activo. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de noche o de mañana entre las tres fases estudiadas.

- *Valor total e incremento nocturno de citrato*

Se muestra en la Figura 20.A, la suma total de la excreción de citrato (mg/L) en orina, noche más mañana; en la Figura 20.B aparece el incremento nocturno de citrato (mg/L), que presenta un valor negativo, resultado de la diferencia mañana menos noche. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la concentración total ni en el incremento nocturno negativo de citrato entre las distintas fases del entrenamiento.

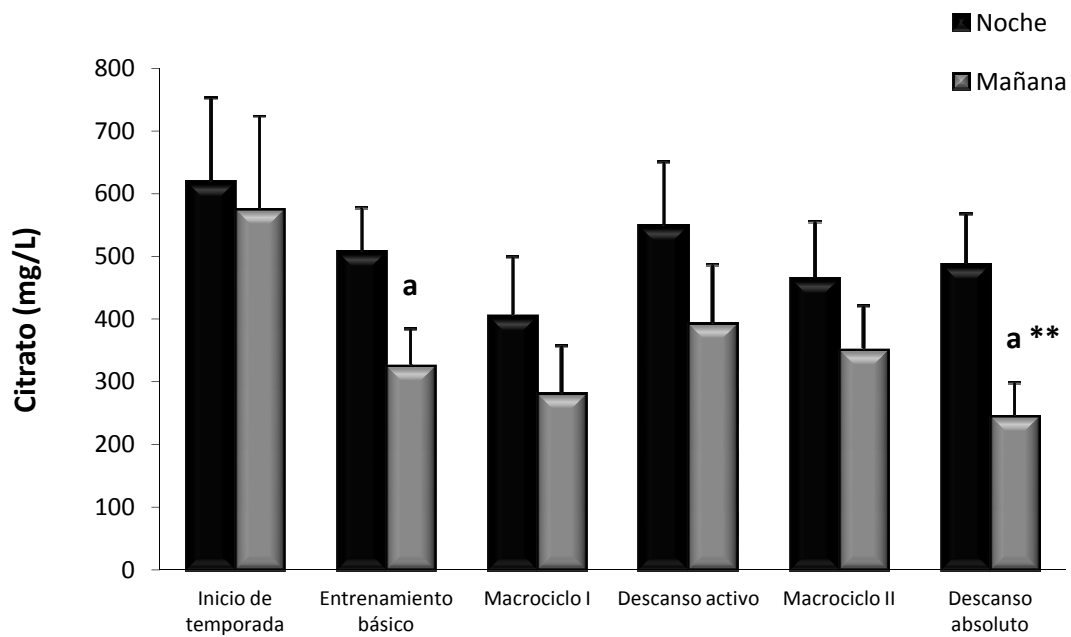
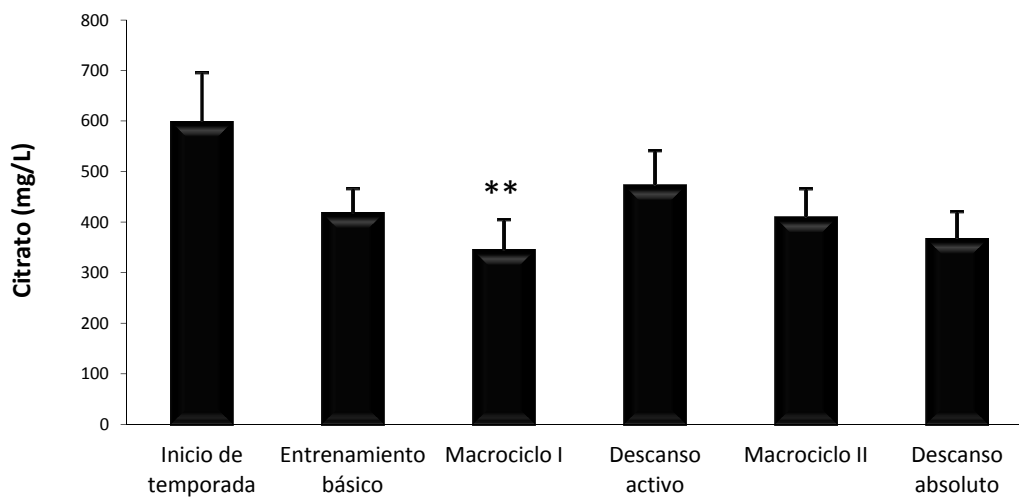


Figura 17. Concentraciones de citrato (mg/L) en orina de nadadores recogida antes de acostarse (noche) y tras levantarse (mañana) en las distintas fases del entrenamiento. Inicio de temporada (n= 12), Entrenamiento básico (n= 10), Macro ciclo I (n= 10), Descanso activo (n= 12), Macro ciclo II (n= 12) y Descanso absoluto (n= 12). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparación de la mañana vs. noche en cada fase, a:  $p < 0,01$ , en Entrenamiento básico y Descanso absoluto. Valores de la mañana, \*\* $p < 0,05$  vs. Inicio de temporada.

A) Citrato total



B) Incremento nocturno

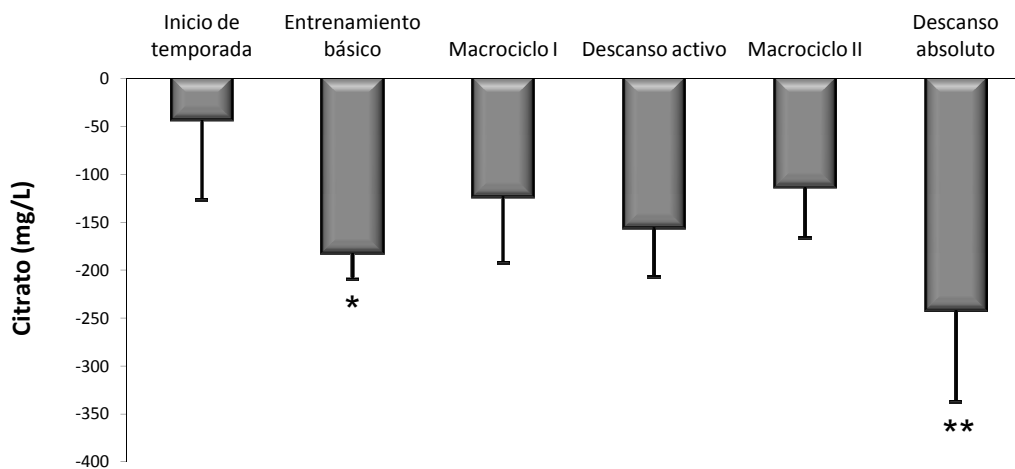


Figura 18. Concentraciones del citrato (mg/L) en muestras de orina recogidas en las distintas fases del entrenamiento de los nadadores. Inicio de temporada (n= 12), Entrenamiento básico (n= 10), Macro ciclo I (n= 10), Descanso activo (n= 12), Macro ciclo II (n= 12) y Descanso absoluto (n= 12). Valores: media  $\pm$  EEM. A: Citrato total, suma de los valores noche más mañana. \*\*p< 0,05 vs. Inicio de temporada. B: Incremento nocturno de citrato, con valores negativos resultado de la diferencia de los valores mañana menos noche. \*p< 0,01, \*\*p< 0,05 vs. Inicio de temporada.

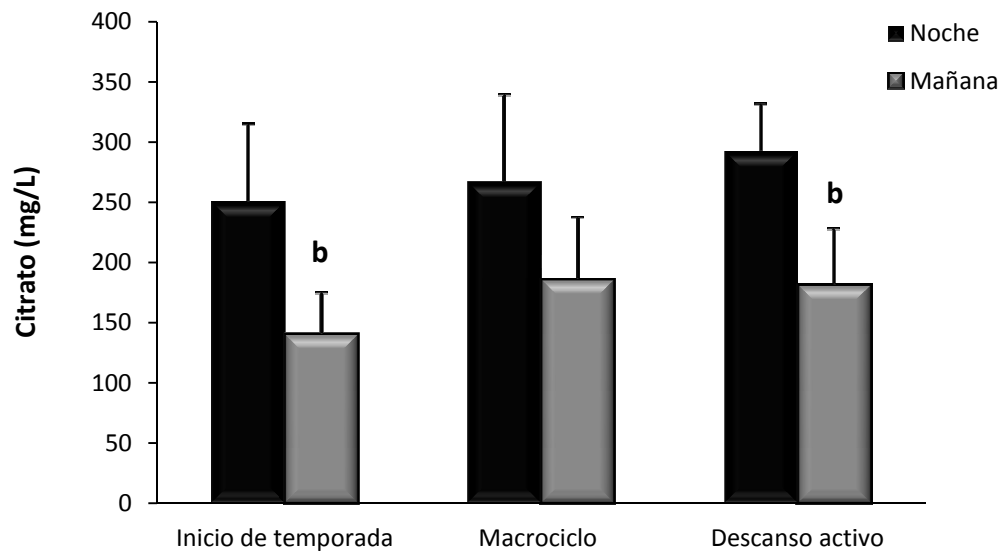
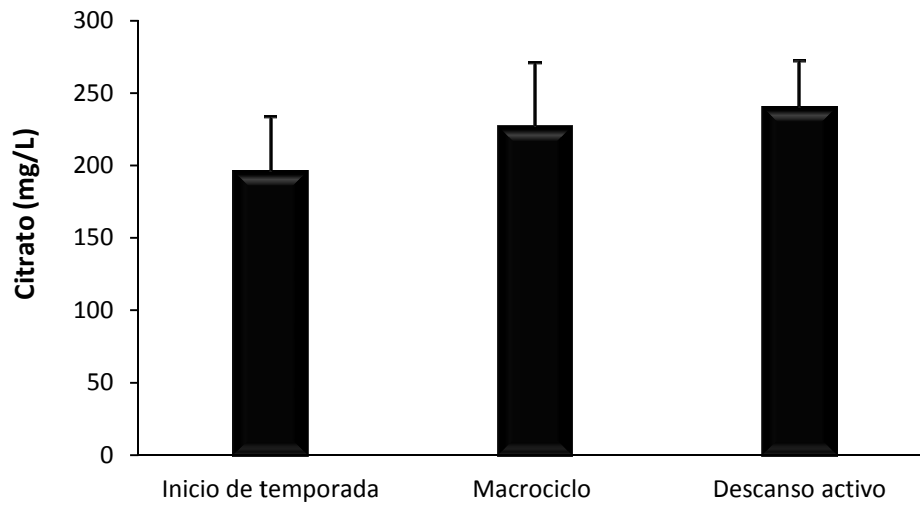


Figura 19. Concentraciones de citrato (mg/L) en orina de piragüistas en las distintas fases del entrenamiento, recogida antes de acostarse (noche) y tras levantarse (mañana). Inicio de temporada (n = 10), Descanso activo (n = 10) y Macro ciclo (n = 9). Valores: la media  $\pm$  EEM. Comparaciones mañana vs. noche, b:  $p < 0,05$ , en el Inicio de temporada y Descanso activo.

A) Citrato total



B) Incremento nocturno

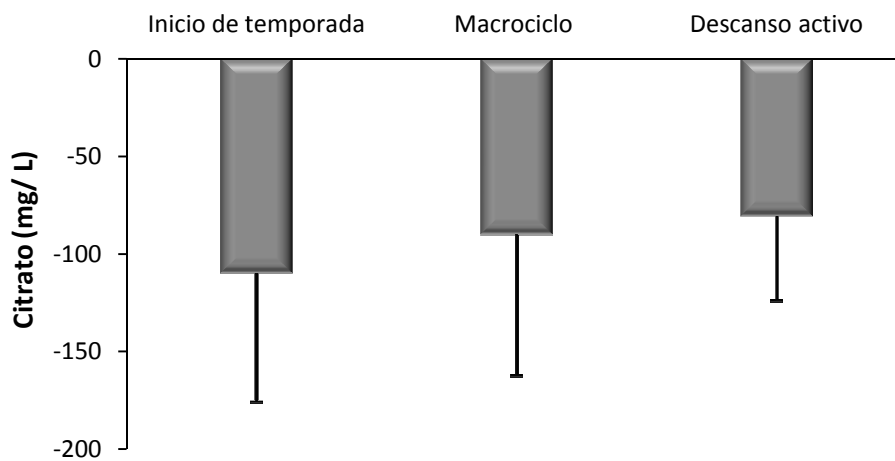


Figura 20. Concentraciones del citrato (mg/L) en orina de piragüistas recogida en las distintas fases del entrenamiento. Inicio de temporada (n= 10), Descanso activo (n= 10) y Macro ciclo (n= 9). A: Citrato total, suma de los valores noche más mañana. B: Incremento nocturno de citrato, con valores negativos resultado de la diferencia de los valores mañana menos noche.



#### 4.2.5.- Razón (mañana/noche) de 6-sulfatoximelatonina y citrato

La razón (mañana/noche) de las concentraciones de  $\alpha$ MT6S ( $\mu\text{g}/$  volumen total de orina) y citrato urinario ( $\text{mg}/\text{L}$ ) de los nadadores y piragüistas en distintos momentos de su temporada de entrenamiento se muestra en la Tabla 12. Esta razón para los valores de  $\alpha$ MT6S en nadadores muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) del Entrenamiento básico con el resto de fases del entrenamiento. Esta misma relación, para los valores del citrato en nadadores muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) del Entrenamiento básico con el Inicio de temporada y el Macro ciclo II. La razón (mañana/noche) de  $\alpha$ MT6S y citrato para los piragüistas no muestra diferencias estadísticamente significativas entre las tres fases estudiadas, siendo sus valores en todos los resultados obtenidos más elevados que en nadadores.

Tabla 12. Valores de la razón mañana/noche

NADADORES					
	Inicio de temporada	Entrenamiento básico	Macro ciclo I	Descanso activo	Macro ciclo II
Razón (mañana/noche)					
$\alpha$ MT6S ( $\mu\text{g}/$ volumen total de orina)	13,91 $\pm$ 2,53 *	41,15 $\pm$ 16,97	15,20 $\pm$ 5,41 *	14,76 $\pm$ 12,34 *	10,15 $\pm$ 8,25 *
Citrato (mg/ L)	1,03 $\pm$ 0,33 **	0,62 $\pm$ 0,05	0,79 $\pm$ 0,20	0,74 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,15 **
PIRAGÜISTAS					
	Inicio de temporada	Macro ciclo	Descanso activo		
Razón (mañana/noche)					
$\alpha$ MT6S ( $\mu\text{g}/$ volumen total de orina)	60,75 $\pm$ 20,28	92,28 $\pm$ 26,74	78,54 $\pm$ 18,42		
Citrato (mg/ L)	2,20 $\pm$ 0,67	2,62 $\pm$ 0,69	3,01 $\pm$ 0,78		

Nadadores: Inicio de temporada (n= 12), Entrenamiento básico (n= 9), Macro ciclo I (n= 10), Descanso activo (n= 12), Macro ciclo II (n= 11). Piragüistas: Inicio de temporada (n= 10), Macro ciclo (n= 8) y Descanso activo (n=10). Valores: media  $\pm$  EEM.  $\alpha$ MT6S ( $\mu\text{g}/$  volumen total de orina): \* $p < 0,01$  vs. Entrenamiento básico. Citrato (mg/L): \*\* $p < 0,05$  vs. Entrenamiento básico.

## 4.2.- Resultados en el modelo animal

### 4.2.1.- Estudio del peso y la ingesta en el modelo animal

- *Peso*

La Figura 21 muestra el peso corporal (gramos, g) de ratas control y de ratas entrenadas, al final de cada uno de los 4 tests (o pruebas) del programa de entrenamiento al que fueron sometidos: test 1 (T1), test 2 (T2), test 3 (T3) y test 4 (T4). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tiempos. Los pesos corporales oscilan entre 304 y 312 gramos.

- *Ingesta sólida*

El valor medio de la ingesta diaria de alimento (g/24h) del grupo control y de ratas sometidas al programa de entrenamiento al final de cada uno de los 4 tests realizados, se muestra en la Figura 22. Los valores oscilan entre 15 y 20 g/24h. Los resultados de la ingesta post-entrenamiento se obtuvieron tras permanecer 24 horas en jaulas metabólicas al final de cada uno de los 4 tests realizados. En el último grupo T4, la mitad de las ratas entrenadas ya habían sido sacrificadas una hora después de haber realizado el último test de entrenamiento, por ello para este grupo la ingesta sólida y líquida se valoró en 10 ratas. Aparecen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre la ingesta control, T1, T3 con T4, y entre la ingesta control y T2.

- *Ingesta líquida*

La Figura 23 indica el valor medio de la ingesta líquida diaria (mL agua/24h), en los grupos control y de ratas entrenadas, de acuerdo al diseño descrito para la ingesta sólida. Los valores oscilan entre 24 y 29 mL agua/24h. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre el grupo T4 y el resto de grupos estudiados. El número de casos en las ratas del grupo T4, coincide con los expuestos y explicados en la Figura 14.

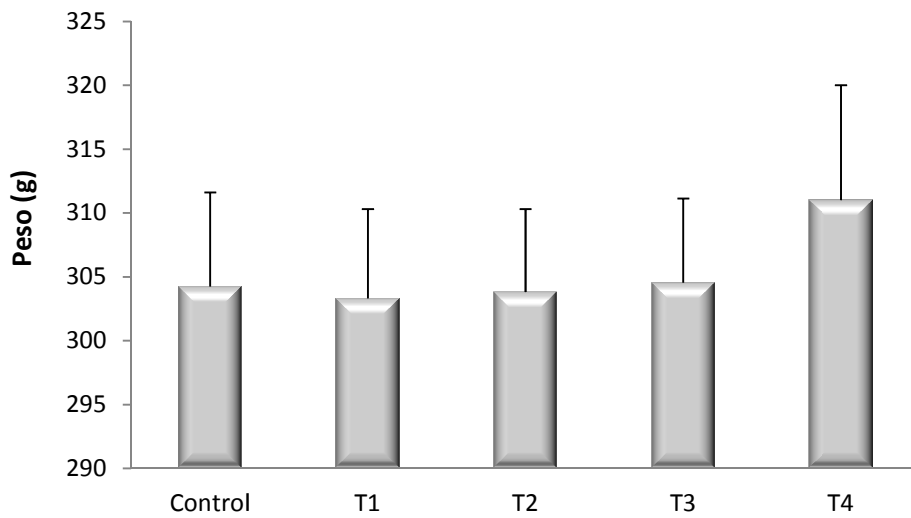


Figura 21. Peso de los animales, control y sometidos a los tests de entrenamiento. Test realizado (T): control (n= 10), test 1 (T1, n= 20), test 2 (T2, n= 20), test 3 (T3, n= 20) y test 4 (T4, n= 20). Valores: media  $\pm$  EEM.

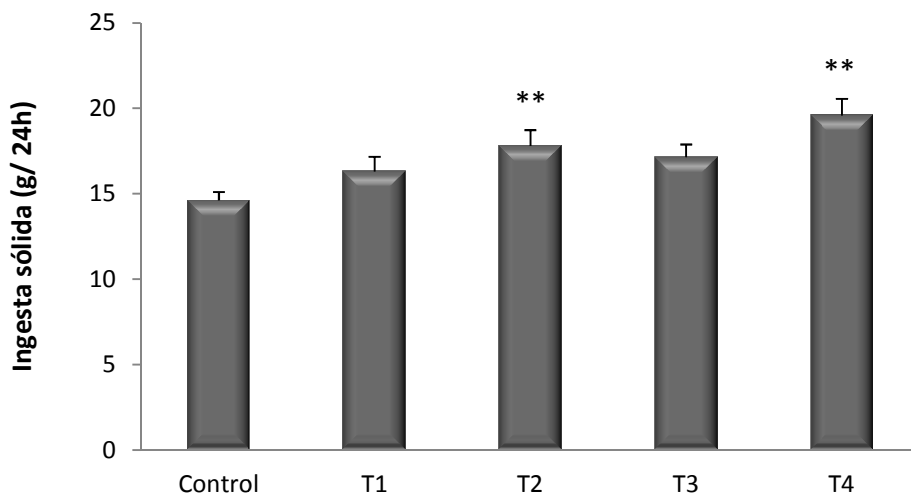


Figura 22. Ingesta diaria de alimento sólido (g/ 24h). Test realizado (T): control (n= 10), test 1 (T1, n= 20), test 2 (T2, n= 20), test 3 (T3, n= 20) y test 4 (T4, n= 10). Comparaciones: \*\*p < 0,05, T4 vs. control, T1 y T3; T2 vs. control.

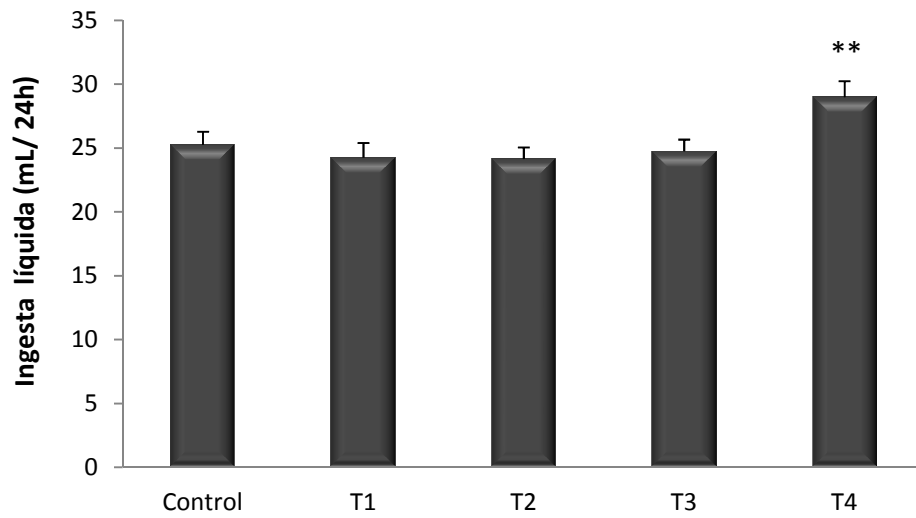
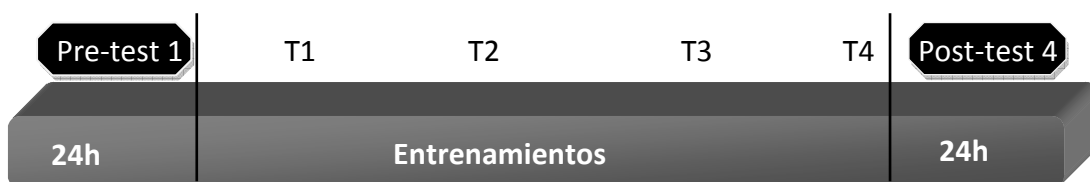


Figura 23. Ingesta diaria de líquidos (mL /24h). Test realizado (T): control (n= 10), test 1 (T1, n= 20), test 2 (T2, n= 20), test 3 (T3, n= 20) y test 4 (T4, n= 10). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones: \*\* $p < 0,05$ : T4 vs. control, T1, T2 y T3.

#### 4.2.2.- Cuantificación de citrato urinario

- *Patrón de excreción urinaria de citrato*

Se muestran los valores de citrato en orina de ratas control y sometidas al programa de entrenamiento en la Figura 24. La primera recogida de muestras comienza a las 11h, cuando finalizaban los tests de entrenamiento. Se recogieron muestras de orina cada 4 horas, obteniéndose un total de 6 periodos (*P1* (11-15h), *P2* (15-19h), *P3* (19-23h), *P4* (23-03h), *P5* (03-07h) y *P6* (07-11h)), 24 horas en total. Las muestras pertenecen al grupo control, al grupo Pre-test1, recogidas en las 24 horas previas a la realización del primer ejercicio, y al grupo Post-test4, recogidas 24 horas tras la realización del cuarto y último ejercicio. De acuerdo al siguiente esquema:



En el grupo Post-test4, se analizaron 10 ratas ya que las 10 primeras habían sido utilizadas para el grupo sacrificado tras 1 hora del ejercicio. Las comparaciones estadísticas mostraron los siguientes resultados:

En los periodos *P1* (11-15h), *P2* (15-19h), *P4* (23-03h) y *P5* (03-07h), no existen diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos estudiados. El periodo *P3* (19-23h), muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de citrato entre los grupos control y Post-test4. En el periodo *P6* (07-11h), diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de citrato entre el grupo Pre-test1 y el grupo Post-test4. En los grupos control y Pre-test1 no hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos periodos, sus valores oscilan entre 5 y 8 mg/L. En las comparaciones dentro del grupo Post-test4, los periodos *P2* (15-19h), *P3* (19-23h), *P4* (23-03h) y *P5* (03-07h) presentan valores significativamente elevados ( $p < 0,01$ ) de citrato respecto a los periodos *P1* (11-15h) y *P6* (07-11h).

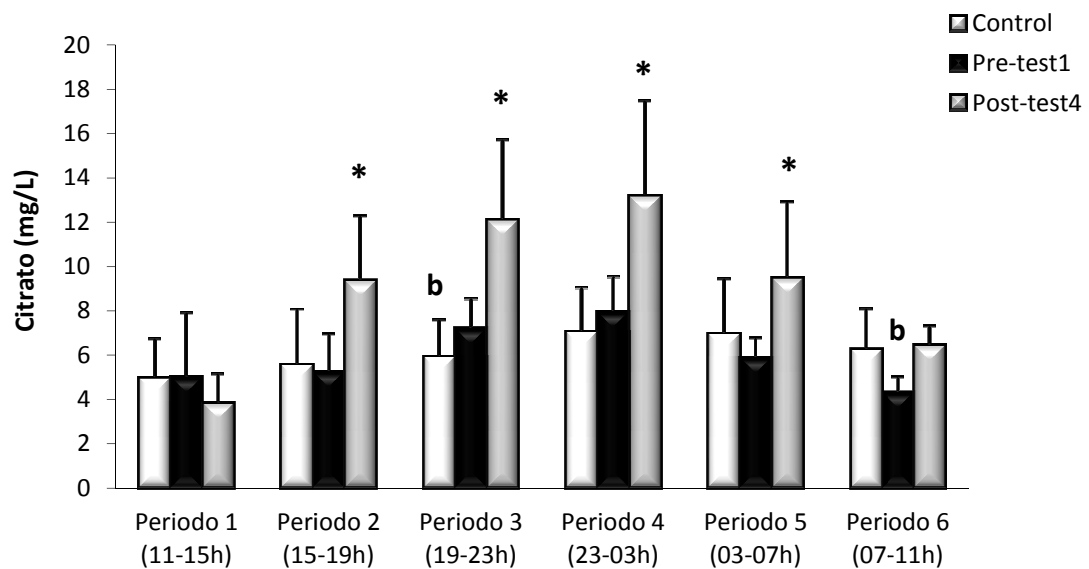


Figura 24. Concentraciones de citrato en orina (mg/L), fraccionadas en 6 periodos de 4 horas. En ratas control y entrenadas, antes del programa de entrenamiento, Pre-test1, y tras finalizar la última prueba, Post-test4. Control (n= 10), Pre-test1 (n= 20) y Post-test4 (n= 10). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones: Valores de control vs. Post-test4 b:  $p < 0,05$ , en el periodo P3. Valores de Pre-test1 vs. Post-test4, b:  $p < 0,05$ , en el periodo P6. Valores de Post-test4: \* $p < 0,01$ , P1 vs. P2, P3, P4 y P5; P6 vs. P2, P3, P4 y P5.

#### 4.2.3.- Membrana mitocondrial intacta

Para poder estudiar la actividad del enzima mitocondrial citrato sintasa (CS), el primer paso es aislar las mitocondrias de las distintas muestras de tejido: hígado y músculos sóleo y gastrocnemio. Para realizarlo se utilizaron dos procesos distintos, uno por rotura mecánica donde se utilizaba el tampón bicina; y otro donde en su lugar, se utilizaba tampón cellytic que rompía completamente la mitocondria, sumando a la rotura mecánica un proceso químico de lisis. La relación entre la actividad citrato sintasa de las preparaciones mitocondriales con tampón bicina frente a la misma actividad pero en las mitocondrias tratadas con el reactivo de lisis Cellytic, proporcionan el porcentaje de mitocondrias rotas (actividad del tampón bicina/ actividad del tampón Cellytic), que se muestra en la Tabla 13.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de rotura mitocondrial grupales en las muestras de hígado ni de sóleo. Sin embargo en el porcentaje de mitocondrias rotas en el gastrocnemio, las muestras de 1 Hora presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con las observadas en los grupos control y 24 Horas.

Tabla 13. Porcentaje de mitocondrias rotas

	CONTROL	1 HORA	24 HORAS
HÍGADO	99,0 ± 0,6	95,1 ± 1,5	96,5 ± 2,0
GASTROCNEMIO	73,6 ± 0,7	51,8 ± 3,0**	86,2 ± 2,5
SÓLEO	79,1 ± 1,0	83,3 ± 1,1	81,0 ± 1,0

Muestra el porcentaje de mitocondrias rotas en los tejidos para los distintos grupos de estudio. Valores: media ± EEM. Comparaciones: gastrocnemio, \*\* $p < 0,05$ , 1 Hora vs. control y 24 Horas.

#### 4.2.4.- Actividad citrato sintasa

- *Actividad citrato sintasa*

La actividad de la enzima citrato sintasa ( $\mu\text{moles/mL/min}$ ) en tejidos de ratas control y sometidas al programa de entrenamiento, 1 hora (1H) ó 24 horas (24H) tras finalizar la última prueba, está representada en la Figura 25. Los tejidos son hígado (H), gastrocnemio (G) y sóleo (S), tratados con tampón bicina (B) o con tampón cellLyctic (C). De acuerdo al siguiente esquema:



Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo de 24H en GC, SB y SC. Aparecen valores significativamente más elevados ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) de actividad CS en el grupo 1H frente al de 24H en HB, HC, GC, SB y SC; y de la actividad CS en el grupo 1H frente al grupo control en GC, SB y SC. Los valores más elevados de actividad CS se observan siempre en el grupo 1H, mientras que los más bajos se observaron en el grupo 24H tras el ejercicio. Los valores más elevados de actividad se observan siempre en el grupo 1H, mientras que los más bajos se observaron en el grupo 24H tras el ejercicio.



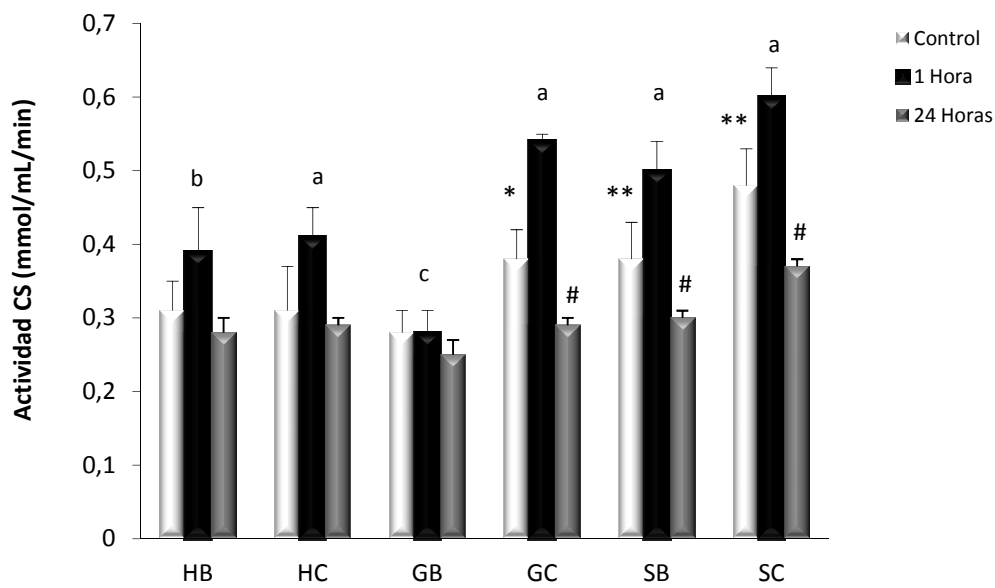


Figura 25. Actividad de la enzima citrato sintasa ( $\mu\text{moles/mL/min}$ ) en tejidos de ratas control y sometidas al programa de entrenamiento, 1 hora y 24 horas tras finalizar la última prueba. Tejidos: hígado (H), gastrocnemio (G) y sóleo (S), tratados con buffer bicina (B) o con buffer cellLytic (C). Control ( $n=10$ ), 1H Post-test ( $n=10$ ) y 24H Post-test ( $n=10$ ). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones: \*  $p < 0,01$  y \*\*  $p < 0,05$ , control vs. 1H Post-test; a:  $p < 0,01$  y b:  $p < 0,05$ , 1H Post-test vs. 24H Post-test. #:  $p < 0,05$ , 24H Post-test vs. control. c:  $p < 0,01$ , grupo 1H Post-test GB vs. grupo 1H Post-test GC.

#### 4.2.5.- Balance hídrico: determinaciones plasmáticas y urinarias

- *Hematocrito*

El valor medio del hematocrito para los distintos grupos de estudio: grupo control y grupos sometidos al programa de entrenamiento, sacrificados 1 hora (1H) y 24 horas (24H) después de finalizar el último entrenamiento, presenta valores significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en los grupos 1H ( $54,7 \pm 9,5\%$ ) y 24H ( $59,5 \pm 6,7\%$ ) respecto a los valores del grupo control ( $48,8 \pm 8,9\%$ ) (Figura 26).

- *Proteína total en plasma*

Los resultados obtenidos de la cuantificación de proteína total en plasma (g/100mL de plasma) en el grupo control y en los grupos sometidos al programa del entrenamiento, se encuentran ilustrados en la Figura 27.

Los valores de proteína plasmática obtenidos están entre 5,6 y 8,4 g/100mL. El grupo 1H ( $7,57 \pm 0,32$  g/100mL) muestra valores significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo 24H ( $6,42 \pm 0,28$  g/100mL).

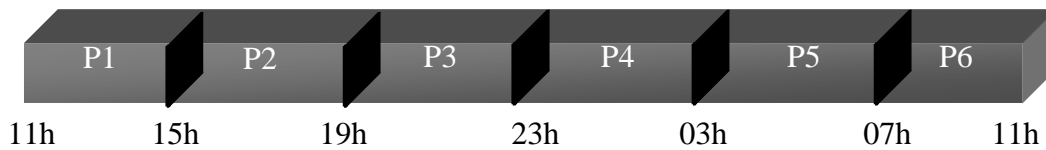
- *Osmolaridad plasmática*

La osmolaridad plasmática en los distintos grupos de estudio (Figura 28), presenta valores significativamente mayores ( $p < 0,01$ ) en el grupo 1H ( $298,0 \pm 1,3$  mmol/kg) frente a los grupos control ( $290,1 \pm 2,2$  mmol/kg) y 24H ( $288,1 \pm 1,1$  mmol/kg). La osmolaridad del plasma toma valores entre 285-299 mmol/kg.

- *Osmolaridad urinaria*

En las Figuras 29, 30 y 31 se muestran los valores de osmolaridad urinaria (mmol/kg) en ratas control y sometidas al programa de entrenamiento. La primera recogida de muestras comienza a las 11h, cuando finalizaban los tests de entrenamiento. Se recogieron muestras de orina cada 4 horas, obteniéndose

un total de 6 periodos (*P1* (11-15h), *P2* (15-19h), *P3* (19-23h), *P4* (23-03h), *P5* (03-07h) y *P6* (07-11h)), veinticuatro horas en total.



Las muestras pertenecen a los 3 grupos: a) grupo control, b) grupo Pre-test1, recogidas en las 24 horas previas a la realización del primer ejercicio y c) grupo Post-test4, recogidas 24 horas tras la realización del cuarto y último ejercicio.

La Figura 29 muestra los valores totales de osmolaridad urinaria para cada grupo, siendo los valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) en el grupo Pre-test1 ( $1504 \pm 196$  mmol/kg) respecto a los del grupo Post-test4 ( $2024 \pm 168$  mmol/kg).

Los resultados de osmolaridad en los distintos periodos de recogida de los grupos, se ilustran en la Figura 30. En los periodos *P5* (03-07h) y *P6* (07-11h), no hay diferencias estadísticas entre los tres grupos estudiados. Mientras que en los periodos *P1* (11-15h), *P2* (15-19h), *P3* (19-23h) y *P4* (23-03h), los valores del grupo Post-test4 son significativamente mayores ( $p < 0,01$ ) a los de los grupos control y Pre-test1.

En el grupo control, animales no sometidos a ningún tipo de entrenamiento, la osmolaridad urinaria (Figura 31.A) del periodo *P1* (11-15h) es significativamente menor ( $p < 0,01$ ) que en los periodos *P2* (15-19h), *P3* (19-23h) y *P6* (07-11h). El Periodo *P3* (19-23h) presentan valores significativamente mayores ( $p < 0,01$ ) que los periodos *P4* (23-03h), *P5* (03-07h) y *P6* (07-11h).

En la osmolaridad urinaria del grupo Pre-test1 (Figura 31.B), el periodo *P1* (11-15h) es significativamente menor ( $p < 0,01$ ) que en los periodos *P2* (15-19h), *P3* (19-23h) y *P4* (23-03h).

Dentro del grupo Post-test4 (Figura 31.C) hay diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre *P1* (11-15h) y los periodos *P2* (15-19h), *P3* (19-23h), y *P4* (23-03h); también existen diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) del periodo *P2* (15-19h) y *P3* (19-23h), con *P4* (23-03h), *P5* (03-07h) y *P6* (07-11h).

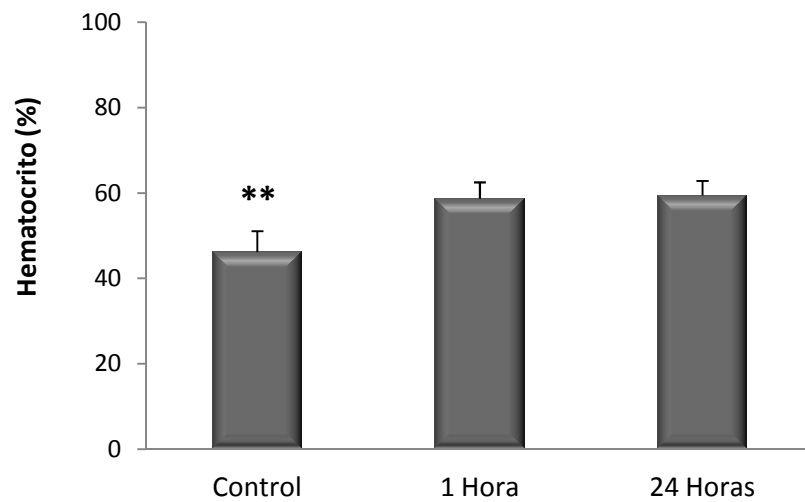


Figura 26. Hematocrito (%), en los grupos control (n= 10) y de ratas entrenadas sacrificadas 1 hora (n= 10) ó 24 horas (n= 10) tras terminar el último entrenamiento. Valores: media ± EEM. Comparaciones: \*\*p< 0,05, control vs. 1 Hora y 24 Horas.

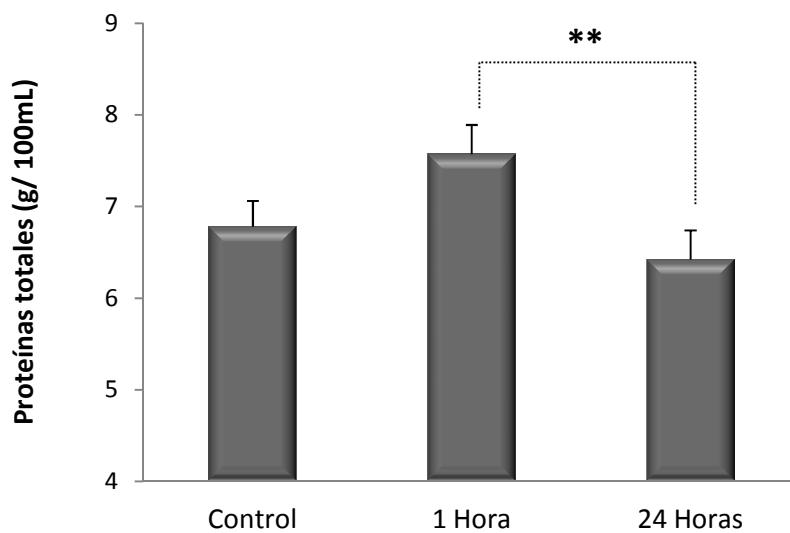


Figura 27. Proteínas totales (g/ 100mL plasma). En los grupos control (n= 10) y de ratas entrenadas, sacrificadas 1 hora (n= 10) ó 24 horas (n= 10) tras terminar el último entrenamiento. Valores: media ± EEM. Comparaciones: \*\*p< 0,05, 1 Hora vs. 24 Horas.

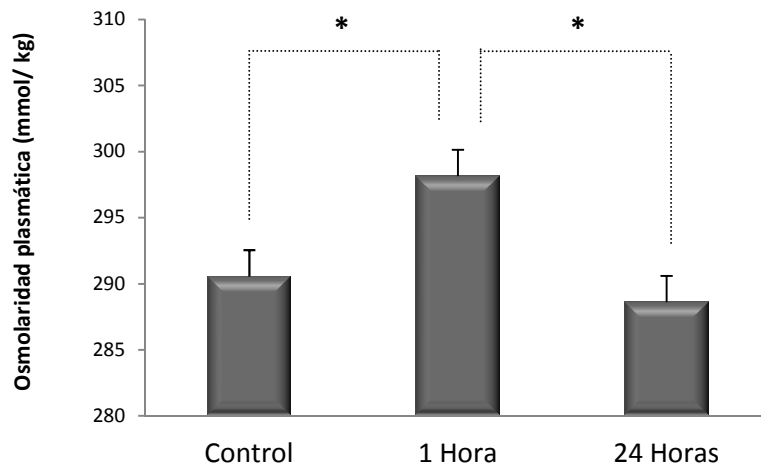


Figura 28. Osmolaridad plasmática (mmol/kg). En los grupos control (n=10) y de ratas entrenadas, sacrificadas una hora (n= 10) ó 24 horas (n= 10) tras terminar el último entrenamiento. Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones: \* $p < 0,01$ , control y 24 Horas vs. 1 Hora.

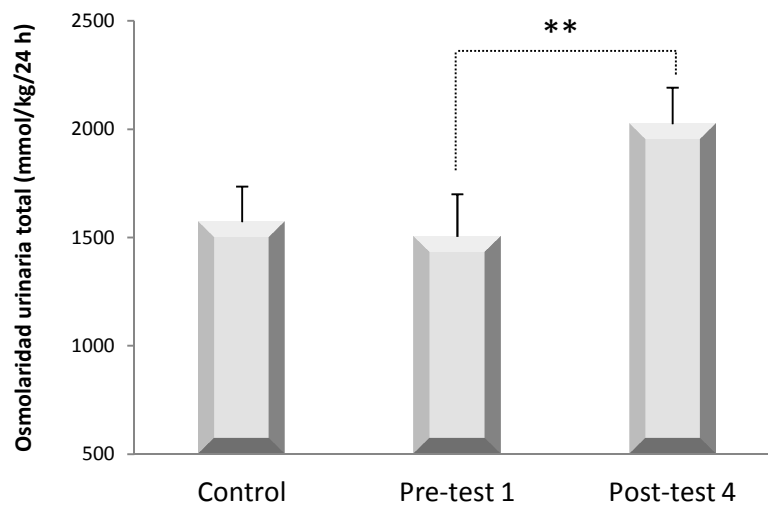


Figura 29. Osmolaridad urinaria total (mmol/kg) de 24 horas. En los grupos control (n=10) y en ratas sometidas a entrenamiento Pre-test1 (n= 20) ó Post-test4 (n= 10). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones: \*\* $p < 0,05$ , Pre-test1 vs. Post-test4.

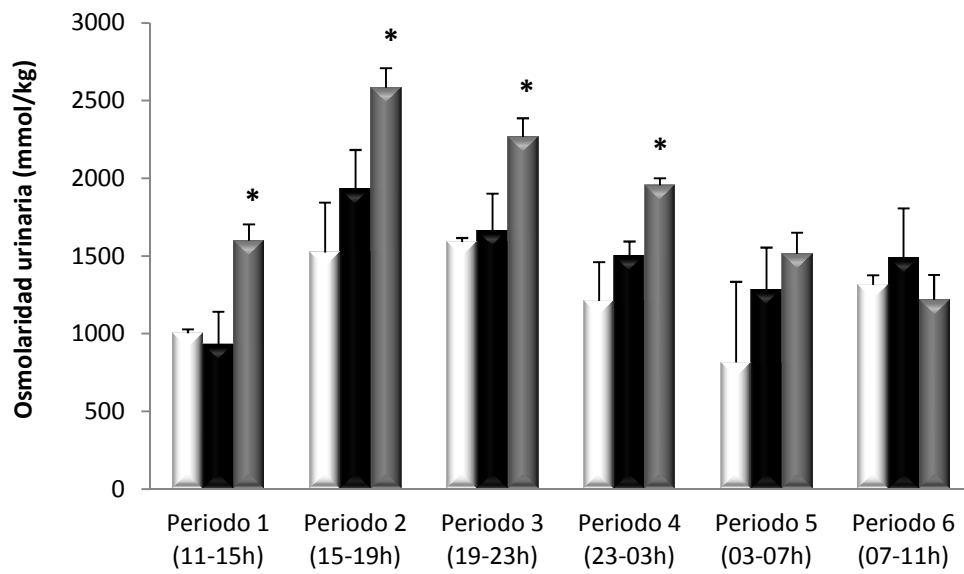


Figura 30. Osmolaridad urinaria (mmol/kg), fraccionadas en 6 periodos de 4 horas, en ratas control (n= 10) y sometidas a entrenamiento, en los tiempos Pre-test1 (n= 20) y Post-test4 (n= 10). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones: \* $p < 0,01$ , en Post-test4 vs. control y Pre-test1 en P2, P3 y P4.

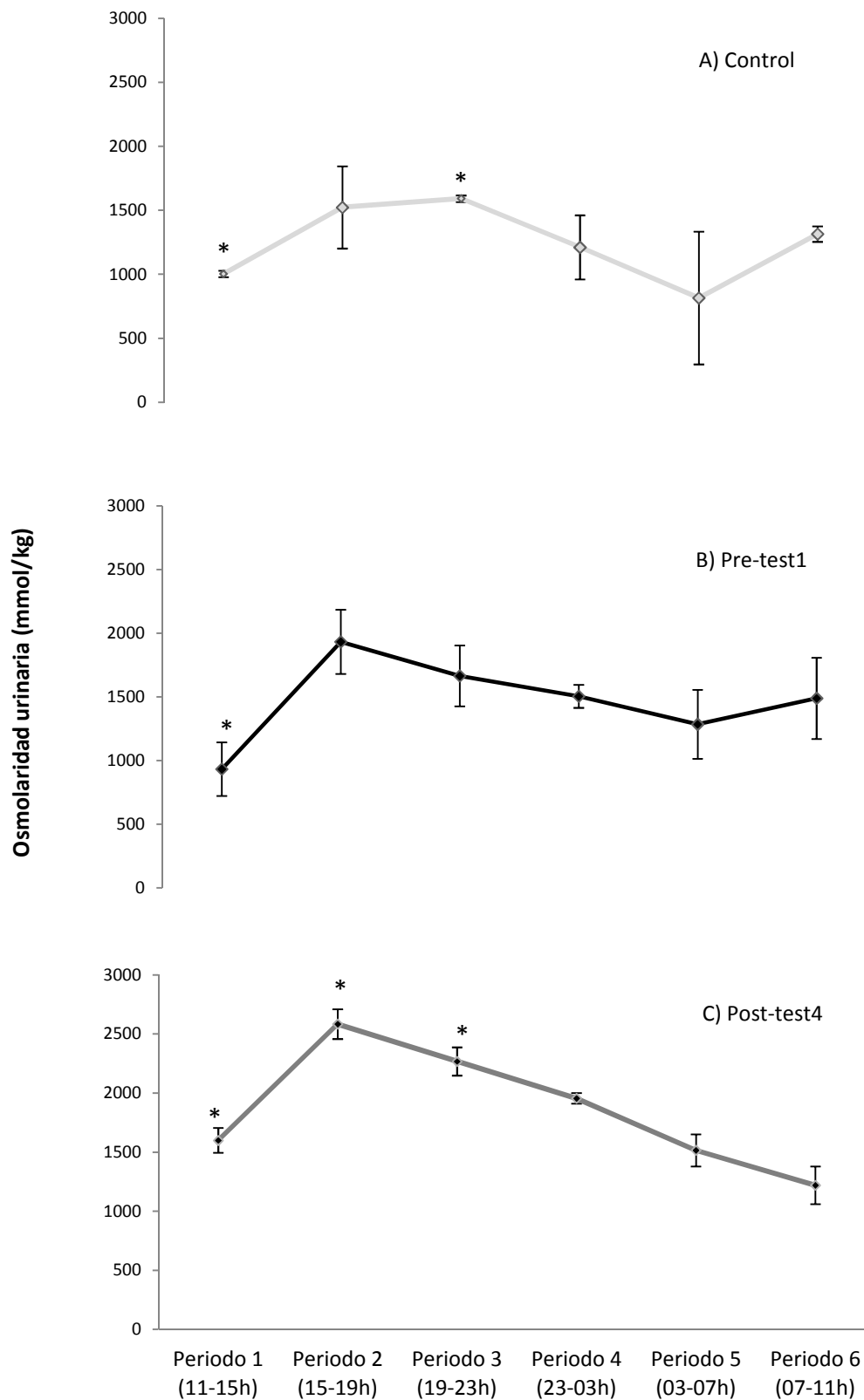


Figura 31. Osmolaridad urinaria (mmol/kg), fraccionadas en 6 periodos de 4 horas, en ratas sometidas a entrenamiento en los tiempos Control (n= 10), Pre-test1 (n= 20) y Post-test4 (n= 10). Valores: media  $\pm$  EEM. Comparaciones: A) \* $p < 0,01$ , P1 vs. P2, P3, P6; P3 vs. P4, P5 y P6. B) \* $p < 0,01$ , P1 vs. P2, P3 y P4. C) \* $p < 0,01$ , P1 vs. P2, P3 y P4; P2 vs. P4, P5 y P6; P3 vs. P4, P5 y P6.

#### 4.2.6.- Actividad neuronal

Para estudiar los efectos del ejercicio de carga progresiva sobre la actividad celular de algunos de los centros hipotalámicos encargados de la regulación del balance hídrico, valoramos su inmunorreactividad c-fos (+) en los diferentes grupos de estudio. Esta es cuantificada como núcleos inmunorreactivos por unidad de área ( $\text{nm}^2$ ). Las localizaciones estudiadas son el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo supraóptico (SON), el núcleo supraquiasmático (SQ) y el órgano subfornical (SFO). Los 3 grupos de estudio son animales control y animales entrenados que fueron sacrificados 1 hora (1H) ó 24 horas (24H) tras el último entrenamiento.

En el PVN aparece una actividad c-fos significativamente mayor en el grupo 1H ( $1147,0 \pm 79,5$ ) respecto a los grupos control ( $957,0 \pm 100,4$ ;  $p < 0,05$ ) y 24H ( $789,6 \pm 89,6$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 32).

También en el SON se aprecian valores significativamente más altos ( $p < 0,01$ ) de inmunorreactividad c-fos en el grupo grupo 1H ( $1200,1 \pm 79,5$ ) respecto a los grupos control ( $336,3 \pm 110,0$ ) y 24H ( $424,1 \pm 199,2$ ) (Figura 33).

Mientras que los valores de núcleos inmunorreactivos c-fos (+) entre los distintos grupos no muestran diferencias estadísticamente significativas ni en el SQ (Figura 34) ni en el SFO (Figura 35).

Los resultados del ensayo inmunohistoquímico realizado aparecen también representados en las Figuras 36 a la 39. En ellas, se muestran fotografías de cortes cerebrales donde se puede observar la localización de la inmunorreactividad c-fos (+) en las áreas estudiadas (PVN, SON, SQ y SFO) y diferenciar la intensidad de la misma entre los distintos grupos (control, 1H, 24H). Además, en cada figura aparece una lámina del atlas estereotáxico de Paxinos (Paxinos y Watson, 1986) a modo de esquema. Para las Figuras 36, 37 y 38 aparece la lámina correspondiente a un corte cerebral de la coordenada estereotáctica bregma -1,3, y para la Figura 39 la correspondiente al corte cerebral de la coordenada estereotáctica bregma -1,8. En la lámina de cada figura aparece marcada la zona cerebral seleccionada para el estudio de la actividad c-fos.



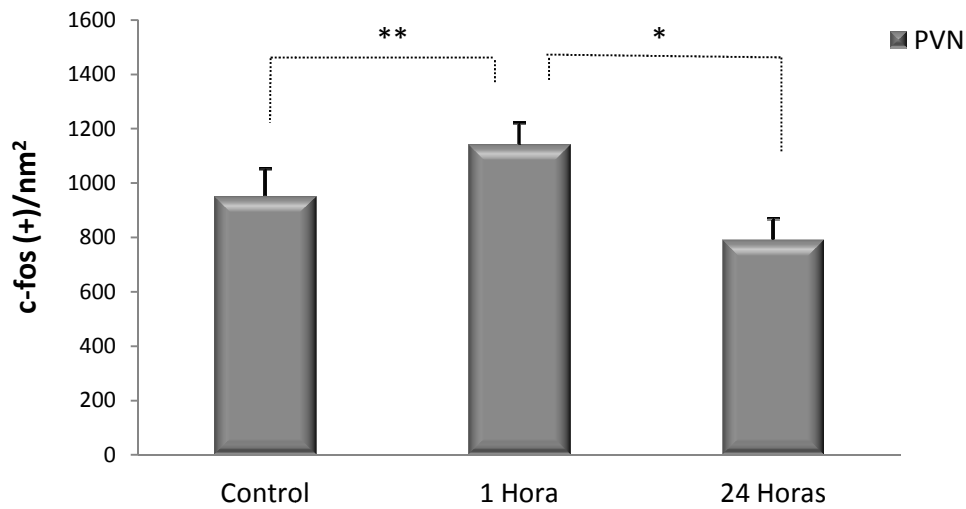


Figura 32. Núcleos c-fos activados en la región del núcleo paraventricular (PVN) por unidad de área (nm<sup>2</sup>). Valores: media ± EEM. \*p < 0,01; \*\*p < 0,05 vs. 1 Hora.

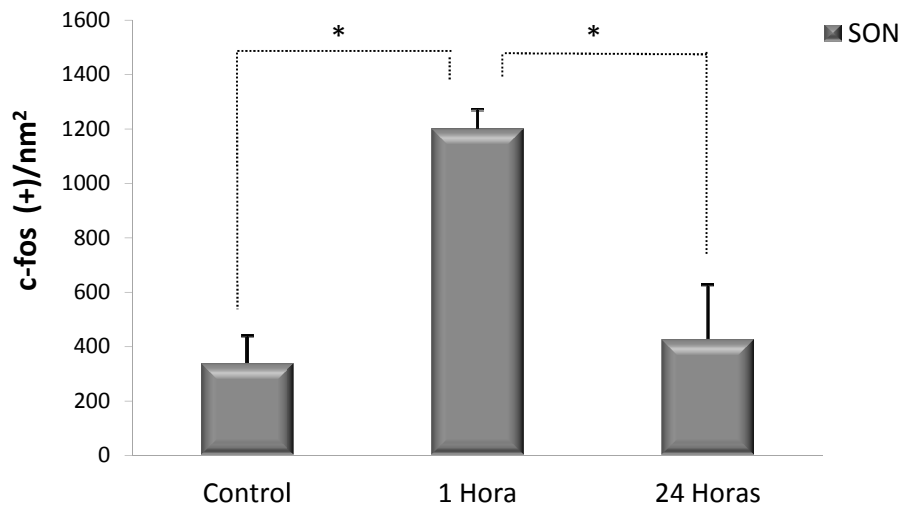


Figura 33. Núcleos c-fos activados en la región del núcleo supraóptico (SON) por unidad de área (nm<sup>2</sup>). Valores: media ± EEM. \*p < 0,01 vs. 1 Hora.

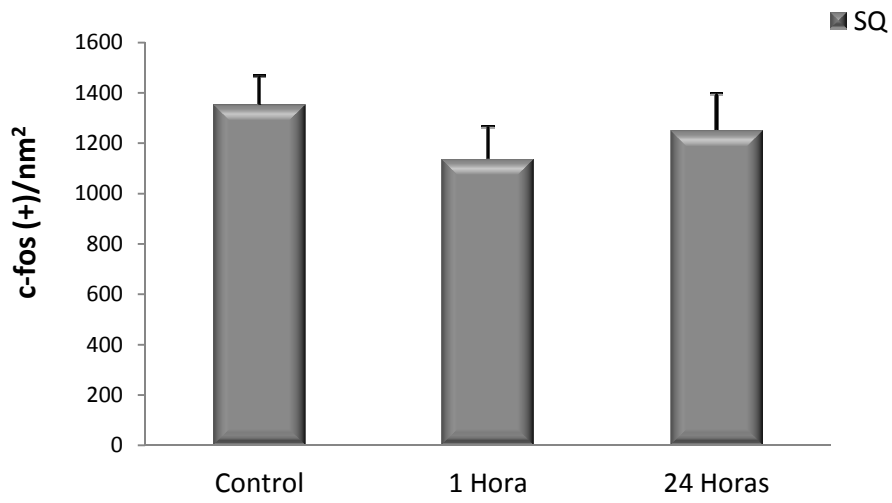


Figura 34. Núcleos c-fos activados en la región del núcleo supraquiasmático (SQ) por unidad de área (nm<sup>2</sup>). Valores: media ± EEM.

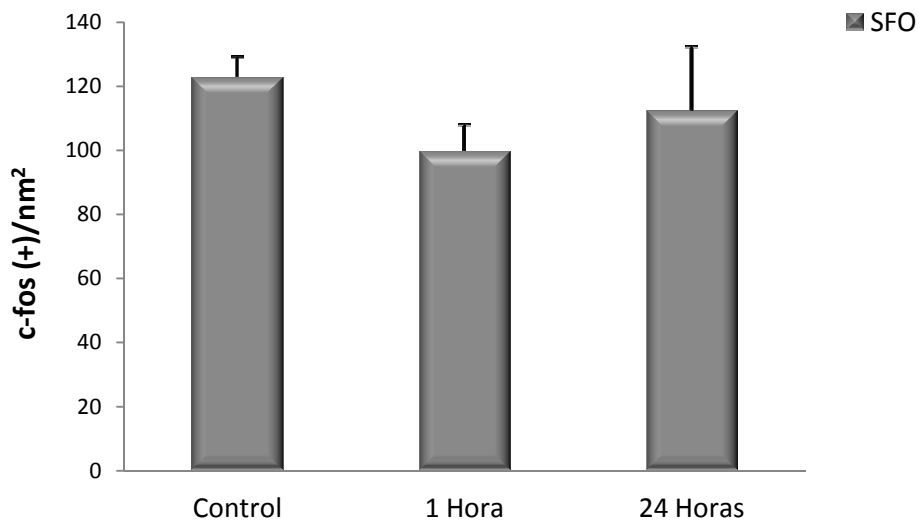


Figura 35. Núcleos c-fos activados en la región del órgano subfornical (SFO) por unidad de área (nm<sup>2</sup>). Valores: media ± EEM.

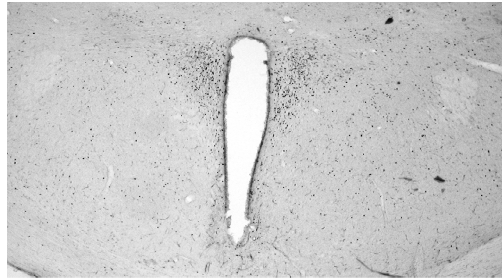
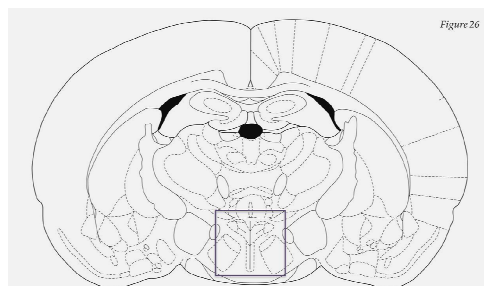
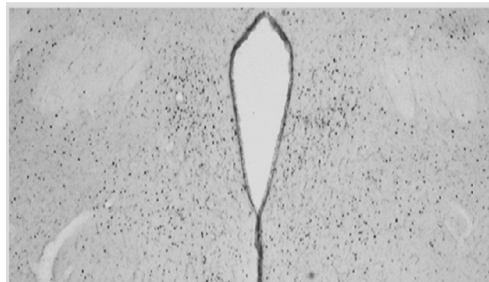
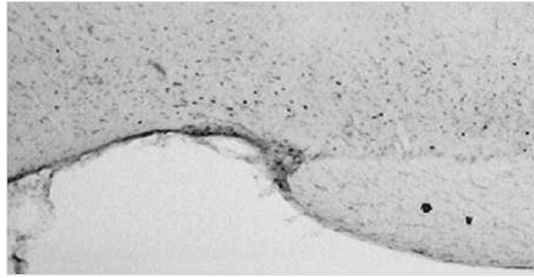
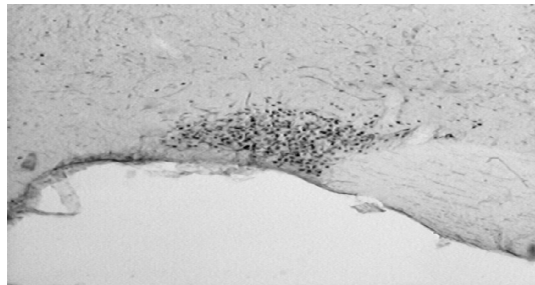
**Control****1 hora****24 horas**

Figura 36. Localización de la inmunorreactividad c-fos (+) en los núcleos de células nerviosas del núcleo paraventricular (PVN), en los distintos grupos de estudio, ratas control o entrenadas (1 hora ó 24 horas tras finalizar el último entrenamiento). Lámina 23 de Paxinos y Watson (1986), bregma -1,3. Aumento 4x.

**Control**



**1 hora**



**24 horas**

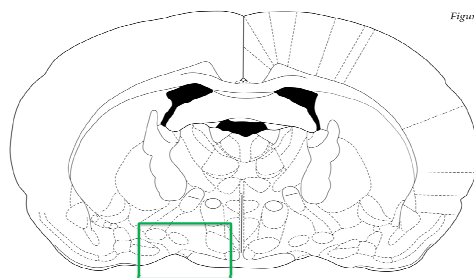
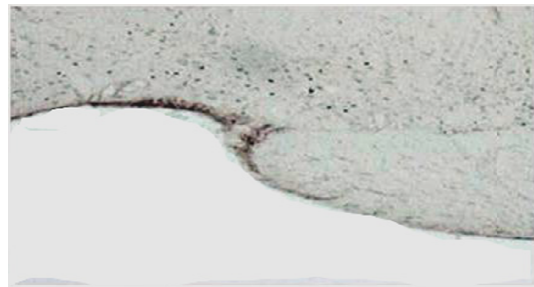


Figure 23

Figura 37. Localización de la inmunorreactividad c-fos (+) en los núcleos de células nerviosas del núcleo supraóptico (SON) en los distintos grupos de estudio, ratas control o entrenadas (1 hora ó 24 horas tras finalizar el último entrenamiento). Lámina 23 de Paxinos y Watson (1986), bregma -1,3. Aumento 4x.

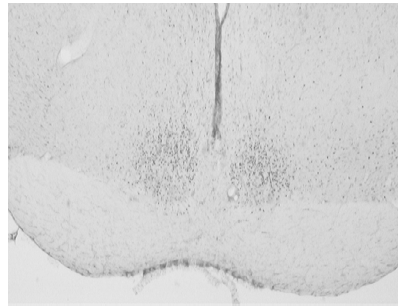
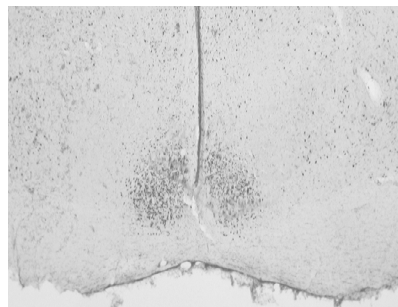
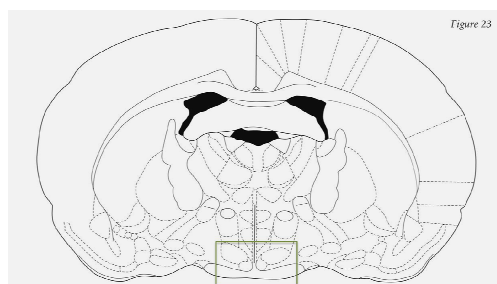
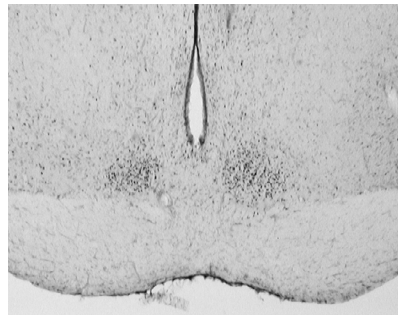
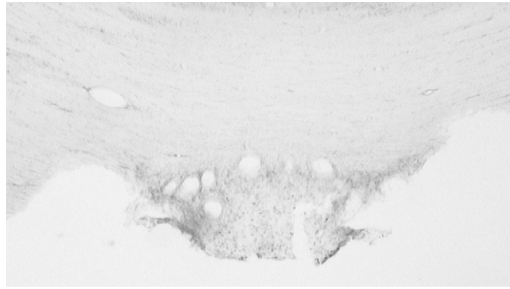
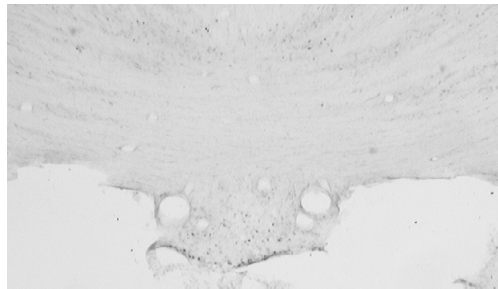
**Control****1 hora****24 horas**

Figura 38. Localización de la inmunorreactividad c-fos (+) en los núcleos de células nerviosas del núcleo supraquiasmático (SQ) en los distintos grupos de estudio, ratas control o entrenadas (1 hora ó 24 horas tras finalizar el último entrenamiento). Lámina 23 de Paxinos y Watson (1986), bregma -1,3. Aumento 4x.

**Control**



**1 hora**



**24 horas**

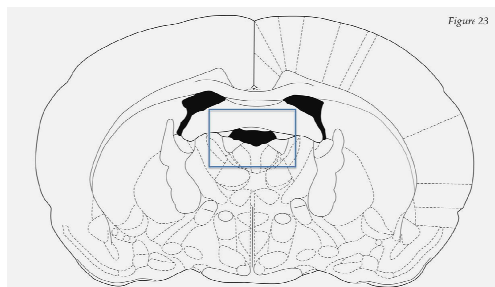
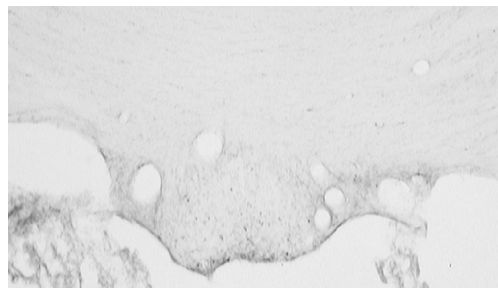


Figura 39. Localización de la inmunorreactividad c-fos (+) en los núcleos de células nerviosas del órgano subfornical (SFO) en los distintos grupos de estudio, ratas control o entrenadas (1 hora ó 24 horas tras finalizar el último entrenamiento). Lámina 26 de Paxinos y Watson (1986), bregma -1,8. Aumento 4x.

**DISCUSIÓN**









## **5.1.-Melatonina en deportistas**

Existen muchos estudios que valoran la respuesta endocrina del organismo tras un esfuerzo físico de corta duración e intensidad elevada, la mayoría son estudios transversales, que no investigan los efectos a largo plazo de un entrenamiento crónico. En el presente estudio se evaluó la respuesta de la melatonina experimentada por deportistas de alto rendimiento (nadadores y piragüistas) a lo largo de su temporada deportiva.

### **5.1.1.- Nadadores**

La excreción urinaria de 6-sulfatoximelatonina ( $\alpha$ MT6S) en los nadadores (Figura 13) muestra la concentración más baja de  $\alpha$ MT6S en la noche, antes de acostarse, en el Entrenamiento básico, el cual incluye una sola sesión de entrenamiento al día, donde se busca principalmente mejorar la capacidad aeróbica de los deportistas. Esto indica que este tipo de entrenamiento no provoca estrés en su organismo. Sin embargo en tres de las cinco fases, Inicio de temporada, Descanso activo y Macro ciclo II, la excreción de  $\alpha$ MT6S presenta valores significativamente elevados comparados con los del Entrenamiento básico, que se interpretan a continuación.

En primer lugar en el Inicio de la temporada, con una intensidad de entrenamiento baja, hay una producción de  $\alpha$ MT6S en la noche más alta que en el Entrenamiento básico. Este incremento podría ser el resultado del estrés o del reajuste del organismo del deportista durante la adaptación al programa de entrenamiento después del periodo vacacional. En segundo lugar, en el Descanso activo, el volumen del entrenamiento desciende pero la intensidad es más elevada, lo cual refleja su influencia en la producción de  $\alpha$ MT6S. Y para finalizar, en el Macro ciclo II que incluye las mayores cargas de trabajo, sesiones de entrenamiento por la mañana y por la tarde, con intensidades de moderadas a alta, la excreción de  $\alpha$ MT6S antes del descanso nocturno (noche) fue 5 veces mayor que en el Entrenamiento básico. Todo esto nos pone de manifiesto la repercusión de la carga de entrenamiento sobre la producción de melatonina, concordando con estudios previos que muestran como el

ejercicio llevado a cabo durante el día puede aumentar los niveles de melatonina (Carr y cols., 1981; Theron y cols., 1984; Ronkainen y cols., 1986; Skinar y cols., 1989; Strassman y cols., 1989; Díaz y cols., 1993; Frisch y cols., 2004).

Los valores de  $^{\alpha}$ MT6S en la mañana reflejan la producción nocturna de melatonina (Figura 13.B), cuando siguiendo su ritmo circadiano alcanza los valores más elevados (Atkinson, 2003; Mahlberg y cols., 2006). El valor más alto de la excreción de  $^{\alpha}$ MT6S en la mañana se observa en el Macro ciclo II, probablemente como resultado de la carga de trabajo, máxima en esa fase. Igualmente, la excreción total y el incremento nocturno de  $^{\alpha}$ MT6S (Figura 14) en el Macro ciclo II mostraron valores significativamente elevados respecto a las fases anteriores, debido a la gran carga de trabajo de esta fase.

Una liberación de catecolaminas aumentada desde las glándulas adrenales durante una situación de estrés, como puede ser una carga elevada de ejercicio, altera la producción de melatonina pineal; dado que la síntesis de la misma está regulada por la noradrenalina liberada desde las terminales nerviosas simpáticas dentro del parénquima pineal (Axelrod y cols., 1969; Marrin y cols., 2011).

Aunque no existen datos de estudios en humanos concernientes a la relación entre excreción de  $^{\alpha}$ MT6S y natación, los resultados de estudios en animales han demostrado un incremento de secreción nocturna desde la glándula pineal en respuesta a la natación (Ueck y cols., 1987; Troiani y cols., 1988a,b; Yaga y cols., 1993). Los mecanismos y la importancia fisiológica de la melatonina en respuesta a la natación son aún desconocidos, sin embargo, se podría tener en cuenta la siguiente consideración. El ejercicio muscular, así como el entrenamiento aeróbico, produce un aumento de radicales libres y otras especies oxidativas reactivas (ROS). Durante el ejercicio físico, la tasa de consumo de oxígeno en humanos puede aumentar hasta 20 veces respecto al valor del consumo en reposo (Brooks y Fahey, 1984). Consecuentemente, durante un ejercicio de carga importante, la generación de ROS incrementa comparado con los valores de éstos en descanso (Di Giacomo y cols., 2009; Andersson y cols., 2010). El efecto protector de la melatonina frente al estrés oxidativo inducido por el ejercicio podría ser una explicación de porqué sus

concentraciones son elevadas durante largos periodos de entrenamiento (Tan y cols., 1993; Reiter y cols., 2009; Serrano y cols., 2010; Ochoa y cols., 2011).

La natación indujo una mayor peroxidación lipídica en músculo, hígado y cerebro de ratas, sin embargo, esta fue inhibida por el tratamiento con melatonina (Hara y cols., 1996; Hara y cols., 1997). El hecho de que la melatonina preservó el contenido de glucógeno en músculo e hígado en ratas que practicaron ejercicio apoya la noción de que la melatonina puede afectar al ejercicio de resistencia en humanos (Mazepa y cols. 2000). Estudios realizados en ratas han puesto de manifiesto que la pinealectomía, resultó en un aumento significativo de los niveles de lactato cuando las ratas fueron sometidas a ejercicio agudo de natación (Baltaci y cols., 2007). Igualmente el mismo grupo de investigación ha encontrado que administrando melatonina a ratas sometidas a ejercicio agudo de natación, los niveles de lactato fueron menores y preservaron mejor el glucógeno hepático, por lo tanto se retrasó la extenuación (Kaya y cols., 2010). Los autores consideran al zinc como mediador de esta acción (Kaya y cols., 2006). Se ha publicado también (Borges-Silva y cols., 2007) que ratas sin glándula pineal entrenadas, tuvieron una capacidad aeróbica y un contenido de glucógeno en hígado y músculo gastrocnemio menores que las ratas control, así como una mayor actividad de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos en los adipocitos. Lo que indica que la glándula pineal es necesaria para el control homeostático del metabolismo energético en el del tejido graso, el músculo y tejido hepático, y por lo tanto la glándula pineal influye en la compleja adaptación al ejercicio de resistencia.

### **5.1.2.- Piragüistas**

La excreción de  $^{\alpha}$ MT6S en piragüistas presenta valores más altos en la mañana que en la noche (Figura 15), mostrando diferencias estadísticamente significativas en todas las fases del entrenamiento, Inicio de temporada, Macro ciclo y Descanso activo. Esto indica que el organismo de estos deportistas sigue los patrones esperados de excreción de melatonina en individuos sanos sedentarios (Mahlberg y cols., 2006), aunque los valores en la mañana son muy altos, alcanzando valores de 7.000  $\mu$ g/L; investigaciones previas muestran como un ejercicio de elevada intensidad realizado

durante el día, varias horas por encima del 50% de  $VO_2$  máximo, es un potente estímulo para la secreción de melatonina durante la noche (Vaughan y cols., 1979; Elias y cols., 1991; Frisch y cols., 2004).

Por otro lado, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la noche (antes de acostarse) de  $^{\alpha}MT6S$  entre las fases del programa de entrenamiento de piragüistas; sin embargo, sí que existen, si comparamos los valores de  $^{\alpha}MT6S$  de la mañana, los cuales reflejan la producción nocturna de melatonina, del inicio de la temporada con las fases restantes (Figura 15.B), que presentan valores significativamente menores.

Igualmente en nuestros resultados, la excreción total así como el incremento nocturno de  $^{\alpha}MT6S$  en los piragüistas (Figura 16), mostraron valores significativamente más elevados en el inicio de temporada que en las fases restantes. Esto indica que el estrés producido en la adaptación al entrenamiento tras un periodo de descanso absoluto, produce un aumento pronunciado en la excreción nocturna que se va descendiendo gradualmente a lo largo de la temporada de entrenamiento, o que resulta de un agotamiento funcional de la glándula pineal debido a esos niveles tan elevados de secreción de la hormona. Estudios recientes han hallado, como la aplicación de estrés en la rata, mediante inyección intramuscular de NE, terminó atrofiando el parénquima pineal y descendiendo la síntesis de melatonina (Tavartkiladze y cols., 2006).

Hay estudios que muestran como el aumento de los niveles plasmáticos de melatonina que ocurría tras el ejercicio se veía atenuado por el entrenamiento regular y vigoroso. En mujeres se midieron los niveles de melatonina antes, durante y tras ser sometidas a un programa de entrenamiento físico (carrera). La producción máxima de melatonina se redujo un 52% tras finalizar el programa de entrenamiento (Skrinar y cols., 1989). Lucía y cols. (2001) estudiaron la respuesta de la melatonina al ejercicio de resistencia aeróbica durante una competición ciclista profesional (La Vuelta a España) de tres semanas de duración. Tanto los niveles de  $^{\alpha}MT6S$  observados en la mañana como en la tarde fueron disminuyendo con el paso de las semanas de competición.

## 5.2.- Citrato urinario en deportistas

### 5.2.1.- Nadadores

El patrón de citrato urinario observado en nadadores (Figura 17) al final del día (noche), es un reflejo del metabolismo oxidativo desde la realización del entrenamiento hasta el momento de toma de la muestra. De acuerdo con Weigand y Remington (1996), las concentraciones de ATP acumuladas debido al menor gasto energético, podrían inhibir la síntesis de citrato durante el periodo de descanso nocturno, mostrando concentraciones bajas de citrato en la orina de la mañana.

Durante el periodo de descanso nocturno, los nadadores experimentan un descenso del metabolismo oxidativo que se refleja en una excreción menor de citrato. Los valores significativamente más bajos de la mañana observados en el Entrenamiento básico y en el Descanso absoluto muestran como durante la noche con el descanso nocturno el organismo experimenta una recuperación metabólica de citrato alcanzando valores más bajos. Al Inicio de la temporada, en los Macroциclos I y II y en el Descanso activo no se observa una recuperación, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la noche y la mañana (Figura 17). En el Entrenamiento básico tiene lugar un entrenamiento de una intensidad moderada, mientras que en los Macroциclos y Descanso activo es de una intensidad de moderada a alta. Así como al Inicio de la temporada el organismo de los nadadores debe adaptarse al entrenamiento tras el descanso, lo que les supone un esfuerzo físico importante.

La excreción total de citrato en nadadores (Figura 18.A) muestra el valor más alto al Inicio de la temporada, después del periodo vacacional, que va disminuyendo gradualmente hasta el Macroциclo I. El entrenamiento aeróbico es progresivo desde el Inicio de temporada hasta el Macroциclo I, cuando la suma total de citrato desciende significativamente, lo cual apoya el punto de vista de que el ejercicio de resistencia mejora la capacidad oxidativa (Taylor y Bachman, 1999; Tang y cols., 2006; Daussin y cols., 2008; Iaia y cols., 2009). Tras el Macroциclo I, durante el Descanso activo, que

implica menos volumen y mayor intensidad de entrenamiento, con más ejercicio anaeróbico, se observó una pérdida del aprovechamiento de la vía oxidativa, mostrando valores más altos de citrato.

Para el citrato, el incremento nocturno (Figura 18.B), mañana menos noche, muestra valores negativos. Una diferencia muy grande representa una recuperación metabólica óptima de los niveles de citrato, esto se observa en el Entrenamiento básico, fase principalmente aeróbica, y en el Descanso absoluto, mostrando ambas fases, valores significativamente mayores a los del Inicio de temporada. El entrenamiento progresivo de resistencia, propicia la adaptación a la vía aeróbica mediante un aumento de la capilaridad por cada fibra muscular mejorando la perfusión de sangre en los músculos, aumentando el número y tamaño de las mitocondrias de los músculos esqueléticos, proporcionando al músculo un metabolismo más eficaz y un incremento de la actividad de las enzimas mitocondriales y de la disponibilidad de los ICAC que producen un funcionamiento más intenso del sistema oxidativo y una mejora de la capacidad de resistencia (Taylor y Bachman, 1999; Daussin y cols., 2008).

Como consecuencia del entrenamiento aeróbico se produce ATP de una forma más eficiente, que inhibe la actividad CS, baja la concentración de citrato, y la actividad PFK, principal punto de regulación de la glucólisis. A partir de este paso la obtención de energía se llevará a cabo principalmente a través de la oxidación de ácidos grasos o lipólisis. Se ha visto que el músculo sometido a entrenamiento de resistencia, favorece la actividad de enzimas implicadas en la beta oxidación de las grasas, por lo que los niveles de ácidos grasos libres se incrementan, esto lleva a un mayor uso de grasas como fuente de energía, preservando así las reservas musculares y hepáticas de glucógeno (Issekutz y cols., 1965; Bordenave y cols., 2008; Hansen y cols., 2009), y evitando la producción de desechos limitantes glucolíticos, como por ejemplo el lactato, retrasando el momento de aparición de la fatiga (Allen, 2008).



### **5.2.2.- Piragüistas**

En piragüistas el patrón de excreción de citrato (Figura 19) presenta concentraciones más bajas en la mañana que en la noche, coincidiendo con lo descrito en los nadadores. Hay diferencias significativas de los valores de la noche respecto a la mañana en el Inicio de temporada y Descanso activo, reflejando una recuperación nocturna de los valores de citrato y por tanto un aumento en los niveles de ATP. El entrenamiento en el Inicio de la temporada para los piragüistas es de una intensidad baja, niveles de lactato 1 mmol/L, luego al organismo no le supone un gran esfuerzo recuperarse. Lo mismo ocurre en el Descanso activo donde el entrenamiento es fundamentalmente anaeróbico, ejercicios cortos de mucha intensidad, y en donde la vía oxidativa o aeróbica glucolítica pasa a un segundo plano, no viéndose comprometida.

La excreción total de citrato en piragüistas (Figura 20.A) no muestra diferencias estadísticamente significativas entre las distintas fases del entrenamiento, aunque va aumentando gradualmente desde el Inicio de temporada hasta el Descanso activo, lo cual muestra que el entrenamiento no consigue una mejor utilización de la vía aeróbica, dado que la carga de trabajo es fundamentalmente anaeróbica. En el incremento nocturno de citrato en piragüistas (Figura 20.B) tampoco aparecen diferencias significativas entre las distintas fases del entrenamiento, el nivel de recuperación nocturno es bastante similar, aunque esta diferencia alcanza su nivel más alto en el Inicio de temporada. Sin embargo, en el Descanso activo el nivel de recuperación nocturna es el menor, indicando que la utilización del metabolismo aeróbico estuvo en detrimento; ya que en el Descanso activo lo que se busca es que en los días previos a la competición no se pierda la forma física y se aumenten las reservas de glucógeno y grasas (triglicéridos) del músculo, intentando así optimizar el rendimiento en la competición.

### **5.3.- Razón mañana/noche de 6- sulfatoximelatonina y citrato en deportistas**

Teniendo en cuenta los resultados de la tabla 12, podemos deducir que ambos parámetros pueden ser marcadores complementarios de la asimilación de la carga de trabajo por el organismo. La melatonina es un parámetro que podría indicar el estrés generado por el entrenamiento y el citrato la formación energética derivada del metabolismo oxidativo y la recuperación metabólica.

Para la  $\alpha$ MT6S, la razón mañana/noche, representa la capacidad de producir melatonina en función de los valores de después del descanso nocturno (mañana) y los valores del final del día (noche). Teniendo en cuenta que el ritmo circadiano de melatonina alcanza en la noche valores que pueden ser 30 veces mayores que durante el día (Atkinson, 2003), nuestros resultados para nadadores indican que el valor elevado de la razón mañana/noche de  $\alpha$ MT6S en el Entrenamiento básico es el óptimo. Sin embargo en las restantes fases del entrenamiento, el valor de la razón mañana/noche de  $\alpha$ MT6S es significativamente menor respecto al Entrenamiento básico, siendo el valor más bajo el del Macro ciclo II. Lo cual nos indica que los nadadores en estas fases están experimentando algún tipo de estrés que afecta a la producción de melatonina durante el día y repercute en su producción nocturna.

Sin embargo para los niveles de citrato, el cual desciende por la noche, un valor de la razón mañana/noche bajo indicaría una mayor renovación de citrato y por tanto una buena recuperación durante el descanso nocturno. El valor más bajo para los nadadores de la razón mañana/noche de citrato, aparece en el Entrenamiento básico, cuando tiene lugar un entrenamiento fundamentalmente aeróbico, mostrando diferencias estadísticamente significativas frente al Inicio de temporada y Macro ciclo II.

Por lo tanto, el Entrenamiento básico es la fase donde el organismo se encuentra menos estresado, el ritmo de melatonina es el correcto, y donde hay una óptima renovación del metabolismo del citrato durante el descanso nocturno.

En los piragüistas no hay diferencias entre los valores para la razón mañana/noche de  $^{\alpha}\text{MT6S}$  de las distintas fases del entrenamiento, la glándula pineal sigue el patrón de excreción normal para un individuo sano, aunque el estrés generado por el entrenamiento, en el caso de los piragüistas con una carga importante anaeróbica y de fuerza, eleva considerablemente los valores de secreción nocturna haciendo que el valor de la razón pueda ser casi del 100% en el Macro ciclo. Tampoco hay diferencias entre las distintas fases de la razón mañana/noche del citrato en piragüistas, el metabolismo del citrato no muestra cambios importantes. El entrenamiento de fuerza o anaeróbico mejora el uso de otras vías distintas a la glucolítica aeróbica y, mejora sólo moderadamente la capacidad oxidativa (Costill, 2001). Lo que se refleja en una peor recuperación nocturna de la razón mañana/noche del citrato en piragüistas, con valores de 2 a 3 veces más elevados que los obtenidos en los nadadores debido a que la renovación de citrato no disminuyó tanto como en estos últimos, cuyo entrenamiento es principalmente aeróbico, siendo capaces de renovar, incluso a intensidades de carga elevadas, el citrato de una forma más eficaz que los piragüistas.

## 5.4.- Citrato en el modelo animal

### 5.4.1.- Citrato urinario

El objetivo del presente experimento fue valorar el patrón de excreción de citrato en orina, ya que no hemos encontrado datos en la literatura sobre este proceso fisiológico.

El citrato producido en las células es reabsorbido de un 65% a un 90% en los túbulos renales. Al practicar la nefrectomía en animales, se produjo un aumento de citrato en plasma, lo cual pone de manifiesto la importancia de los riñones en la excreción de citrato (Simpson, 1983; Hamm, 1990). El hecho de que hasta el 90% de citrato puede ser reabsorbido en los túbulos renales explica la baja excreción de citrato en orina que se observa en condiciones basales, o grupo control, donde nuestros valores oscilan entre 5 y 8 mg/L. Sin embargo, tras un periodo de entrenamiento, sí que se observan cambios importantes de las concentraciones de citrato en orina (Figura 24). El patrón de excreción urinario de citrato refleja una distribución normal, o de Campana de Gauss, lo que indica que una vez producido el citrato en las células, tarda un tiempo de 4 horas en comenzar a aparecer en orina (*P2*, 15-19h), el valor máximo se observa a las 16 horas (*P4*, 23-03h), y permanece aún elevado hasta 20 horas (*P5*, 03-07h) tras la actividad física.

Las  $\frac{3}{4}$  partes del citrato filtrado son reabsorbidas en el túbulo proximal y sólo  $\frac{1}{4}$  parte se pierde en la orina (Grollman y cols., 1961). El citrato en el túbulo proximal, es transportado como anión divalente dependiente de  $\text{Na}^+$  y su carga eléctrica positiva favorece su entrada en la célula (Wright y cols., 1980). Cuando se realizó el programa de entrenamiento, como consecuencia de la demanda de energía que conlleva el entrenamiento físico, las células producen cantidades mucho mayores de citrato; las cuales pasan al plasma, llegan al riñón donde los transportadores están saturados y el exceso de citrato es eliminado en la orina.

Estos resultados nos ayudan a comprender el patrón de excreción de citrato obtenido en nadadores (Figura 17), donde la mejor recuperación de citrato se obtuvo

en el Descanso absoluto y en el Entrenamiento básico; pero que sin embargo, con cargas de entrenamiento mayores al haber mayor producción de citrato, no se consiguió la reabsorción tubular correcta.

#### 5.4.2.- Actividad citrato sintasa

El hígado es considerado como uno de los órganos que utiliza el citrato para sus funciones metabólicas, tiene importancia por su interacción en la biosíntesis de los ácidos grasos y en la gluconeogénesis (Nehlmen y Hanson, 1972; Piot y cols., 1998). El músculo estriado es igualmente una fuente importante de citrato aportado a la sangre (Godwin, 1968; Jansson y Kaijser, 1987). El enzima citrato sintasa es uno de los principales reguladores del Ciclo de Krebs, que forma parte de la vía catabólica que realiza la oxidación de glúcidos, lípidos y aminoácidos, produciendo CO<sub>2</sub> y liberando energía en forma de ATP.

En relación con la producción de energía, se estudió la evolución en el peso corporal de nuestros animales y su ingesta en respuesta al programa de entrenamiento al que fueron sometidos. La ingesta (Figura 22), mostró un incremento significativo durante el entrenamiento, pero que no fue en paralelo con un incremento significativo del peso corporal (Figura 21). Lo cual puede indicar que esta mayor ingesta se está utilizando para la producción de energía. Los procesos recuperativos (procesos constitutivos o anabólicos), no sólo procuran volver al punto de partida ante el esfuerzo, sino más bien, tienden a sobrepasar los niveles iniciales de capacidad. El organismo consume energía para además de restaurar los depósitos energéticos agotados, aumentar las reservas funcionales y evitar un vaciado de los depósitos en el caso de que ocurriese un esfuerzo más intenso (Gómez- Carramiñana y Pascual, 1997). Ingiere más cantidad de comida para recuperar y aumentar sus reservas, pero con el consumo energético del ejercicio del programa de entrenamiento mantienen un peso más o menos estable.

La actividad CS ( $\mu\text{mol/mL/min}$ ) fue valorada en las mitocondrias obtenidas de hígado y músculos sóleo y gastronecmio, tejidos sometidos a dos procesos de aislamiento mitocondrial diferentes y que han sido previamente descritos (apartado 3.2.4). Respecto al porcentaje de mitocondrias rotas en estos procesos de aislamiento

(Tabla 13), vemos que el valor mayor en el grupo 1 hora tras el ejercicio se obtiene en el hígado, seguido del sóleo y por último en el gastrocnemio. En este último tejido vemos que el porcentaje de mitocondrias rotas es significativamente menor en el grupo 1 Hora frente a los grupos control y 24 Horas, esto puede explicar en parte porque hay una marcada diferencia entre la actividad CS en el gastrocnemio comparando los resultados del proceso de aislamiento con tampón bicina (GB) frente al CelLytic (GC) en el grupo 1 Hora (Figura 25). Al encontrarnos con menor rotura mitocondrial en GB también habrá menos enzima expuesta que pueda reaccionar, dando lugar a una menor actividad CS, similar en los tres grupos estudiados (control, 1 Hora y 24 Horas tras el ejercicio).

La CS es una de las principales enzimas del Ciclo de Krebs, que forma parte de la vía oxidativa para la obtención de energía, que se encuentra en la matriz mitocondrial. De los resultados de la actividad CS (Figura 25) en las muestras de tejido muscular, gastrocnemio y sóleo, tras 1 hora de haber finalizado el ejercicio, podemos deducir que, de los 2 preparados mitocondriales, los tratados con CelLytic, al romper las mitocondrias disponibles mecánicamente y químicamente, presentan valores más elevados que los preparados mitocondriales tratados con tampón bicina, cuyas mitocondrias sólo se rompen mecánicamente como resultado del proceso de aislamiento. En el gastrocnemio se observa una actividad CS significativamente mayor en el precipitado mitocondrial con CelLytic respecto al preparado mitocondrial con tampón bicina; lo mismo ocurre en el sóleo, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. Esto es debido a la mayor presencia de mitocondrias en las fibras musculares del sóleo que en el gastrocnemio, por lo que esta mayor disponibilidad facilita la capacidad de reacción del enzima CS. Por otra parte, el hígado, no muestra la característica diferencia entre ambos preparados mitocondriales, con tampón CelLytic o bicina. Probablemente, debido a que el proceso de tratamiento es diferente para el “tejido blando” (hígado) y el “tejido duro” (músculo), se observó una mayor rotura mitocondrial en el procesado del hígado (99%) que en el del sóleo (73%) y gastrocnemio (79%) (Tabla 13).

El ejercicio es un desafío para varios órganos, como es el caso del hígado, que desempeña muchas funciones vitales, muchas de las cuales están relacionadas con el

metabolismo. El hígado es especialmente importante en el mantenimiento de concentraciones normales de glucosa y lípidos en la sangre, y como proveedor de energía al músculo esquelético y al cerebro (Córdova, 1997). Debido a las limitaciones para estudiar la respuesta hepática en los seres humanos y para aclarar la influencia del ejercicio sobre el hígado se utilizan modelos de ejercicio en roedores. En nuestros resultados la actividad CS es significativamente mayor 1 hora después de realizar el ejercicio que a las 24 horas de su finalización, siendo mayor también respecto al grupo control, aunque en este caso no de manera significativa. Esto indica como el hígado, una hora tras el ejercicio, necesitaría un aporte energético extra, se encuentra creando glucosa para ceder al músculo y que así este pueda recuperar el glucógeno perdido y almacenarlo; colabora en la reparación de los músculos mediante la biosíntesis de proteínas; aumenta el depósito muscular de grasas con la biosíntesis de triglicéridos y facilita la eliminación de posibles residuos generados durante el ejercicio (transformación del amonio en urea) (De Feo y cols., 2001).

Con el entrenamiento crónico, tienen lugar muchas adaptaciones en el sistema neuromuscular. El gastrocnemio es un músculo principalmente glucolítico, es decir, tiene una alta proporción de fibras rápidas tipo II, estas fibras poseen un bajo número de mitocondrias y por lo tanto no presentan una gran capacidad oxidativa, aunque sí glucolítica anaeróbica (McArdle, 2004). La actividad CS más alta se da 1 hora tras el ejercicio y los niveles descienden hasta niveles más bajos, incluso que los control, 24 horas después de la ejecución del último ejercicio.

El segundo músculo estudiado en el presente trabajo, el sóleo (Figura 25), es un músculo con una alta proporción de fibras lentas, tipo I, ricas en mitocondrias, y por tanto con una alta capacidad oxidativa (McArdle, 2004). El porcentaje de mitocondrias rotas en este tipo de tejido es alto y similar en los diferentes tiempos estudiados (Tabla 13), lo cual pone de manifiesto su diferente composición muscular respecto al gastrocnemio. La actividad CS más elevada, al igual que en el músculo gastrocnemio, se observa 1 hora tras realizar el último ejercicio, descendiendo a las 24 horas hasta valores inferiores a los control. Leandro y cols., (2007) estudiaron los efectos de un modelo de entrenamiento de intensidad moderada durante 10 semanas sobre la

actividad CS en el músculo sóleo. Vieron un incremento de  $VO_2$  máximo paralelo con una elevación de la actividad CS de hasta un 42 %.

La elevada actividad CS observada 1 hora tras el ejercicio y su descenso significativo 24 horas después en ambos tipos musculares, podrían explicarse como una consecuencia de la fase de recuperación y de los efectos de sobrecompensación experimentados por el músculo tras el ejercicio. El aumento de la actividad CS, enzima crítica en el metabolismo aeróbico, posiblemente esté relacionada con un elevado  $VO_2$  máximo que puede alcanzarse durante los periodos de recuperación.

Incluso cuando se hacen sprints cortos (40 metros), se ha observado que el  $VO_2$  asciende un 52, 57 y 66% del  $VO_2$  máximo cuando entre los sprints se descansa 120, 60 ó 30 segundos respectivamente (Balson y cols., 1992). En general el aumento de la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo aeróbico es más frecuente cuando en el entrenamiento se usan sprints largos (más de 10 segundos) o bien cuando se usan sprints cortos (menos de 10 segundos) con un periodo de recuperación entre sprints inferior al minuto (Ross y Leverit, 2001).

Una adaptación fisiológica fundamental inducida por el ejercicio aeróbico es además de un aumento de la capilaridad, un incremento en el contenido mitocondrial a lo largo de las fibras musculares entrenadas (Holloszy, 1967; Kirkendall y Garrett, 1998; Rodríguez y cols., 2002; Iaia y cols., 2009). Este aumento de la disponibilidad del oxígeno y el mayor contenido mitocondrial, incrementan la capacidad de provisión de energía aeróbica desde los ácidos grasos y la oxidación de carbohidratos, y puede encontrarse tanto en fibras lentas como rápidas cuando ellas parecen adaptadas al programa de entrenamiento. Si bien se pensó previamente que esta capacidad enzimática incrementada no es utilizada debido a que el contenido mitocondrial fue considerado en exceso para las necesidades máximas, aún en el músculo desentrenado normal (Gollnick y Saltin, 1982); hay evidencias que indican que un incremento en el contenido mitocondrial es necesario para la provisión aeróbica de ATP inducida en el músculo por el entrenamiento (Robinson y cols. 1994; Hepple, 2000). El incremento en el contenido mitocondrial mejora el control del metabolismo de energía, influyendo en



las fibras musculares favoreciendo la oxidación de más ácidos grasos y menos glucógeno (Talanian y cols., 2007; Talanian y cols., 2010).

Resultados previos muestran como el entrenamiento de resistencia aeróbica resultó en un incremento de la actividad del enzima CS, precursor de la síntesis de citrato, en hombres (McKenzie y cols., 2000; Tang y cols., 2006; Tarnopolsky y cols., 2007; Perry y cols., 2008), en mujeres y hombres (Roesptorff y cols., 2005); en ratas (Terada y cols., 2004; Yaspelkis y cols., 1999; Betik y cols., 2008) o en caballos (Serrano y cols., 2000; McGowan y cols., 2002; Kim y cols., 2005). Igualmente se ha descrito como el entrenamiento de resistencia mejoró la actividad del enzima CS y la capacidad oxidativa del músculo (Bordenave y cols.; 2008 Hansen y cols., 2009). Todos estos datos indican que durante el entrenamiento el gasto energético de ATP ha sido suficientemente elevado y consecuentemente la actividad del enzima CS aumenta, incrementando la producción de citrato.

## **5.5.- Balance hídrico en el modelo animal**

En este estudio se busca caracterizar en mayor profundidad los efectos de un entrenamiento progresivo sobre el patrón de la actividad neuronal de la rata Wistar. Para ello, se utiliza como marcador de la actividad neuronal, la activación del gen c-fos en varias regiones hipotalámicas implicadas en la homeostasia. Además, se trata de establecer una relación entre este patrón de actividad y el aumento transitorio tras el ejercicio de diferentes variables bioquímicas como la osmolaridad, tanto plasmática como urinaria, el hematocrito y la concentración de proteínas totales plasmáticas.

### **5.5.1.- Determinaciones plasmáticas y urinarias**

La homeostasia hídrica o balance del agua corporal, es el resultado del equilibrio entre el consumo y la pérdida de agua (Mudge y Weiner, 1990). La deshidratación progresiva durante el ejercicio es un fenómeno frecuente que se produce cuando no se ingieren suficientes fluidos para reponer las pérdidas producidas (Kovacs y cols., 2002). Los animales de este estudio, a los que no se les permitía beber durante la realización del ejercicio, podían recuperar las posibles pérdidas de líquidos únicamente tras la finalización del mismo.

Los resultados de la ingesta hídrica a las 24 horas de finalizar el test 4 (Figura 23) muestran un aumento significativo respecto a la ingesta del grupo control y de los tests anteriores (T1, T2 y T3). Esto señala que el test 4, el de mayor intensidad de todo el programa de entrenamiento, es capaz de desencadenar mayor ingesta hídrica, como resultado de una mayor deshidratación debida a la mayor carga a la que estuvieron sometidos los animales durante el ejercicio.

Para evaluar el estado de hidratación se usan índices sanguíneos, tales como el hematocrito, la concentración de proteína total y la osmolaridad plasmáticas. La sangre está formada por dos porciones: aproximadamente un 55% es plasma sanguíneo y un 45% son elementos formes (valor denominado hematocrito), constituidos por células y fragmentos celulares (eritrocitos, plaquetas, leucocitos).

Ambas porciones pueden cambiar de volumen de forma independiente y modificar así, el volumen total de la sangre, alterando con ello la osmolaridad plasmática y el valor de hematocrito (Wilmore y Costill, 2001).

Los resultados de la osmolaridad plasmática que hemos obtenido en este trabajo (Figura 28) muestran valores significativamente mayores una hora tras finalizar el último test (test 4) respecto a los valores control y tras 24 horas del último entrenamiento. Esto puede ser provocado por un descenso del volumen plasmático debido a la pérdida de líquidos durante el ejercicio, que estaría restablecido a las 24 horas, dando lugar a valores de osmolaridad similares a los controles.

Se ha visto que inmediatamente después de un ejercicio de corta duración e intensidad elevada, realizado hasta la extenuación, se produce una disminución del volumen plasmático de entre un 10 y un 20%, y por lo tanto un aumento de la osmolaridad plasmática que tras un tiempo de recuperación vuelve a valores basales. Este descenso del volumen plasmático incrementa la concentración de hematíes entre un 20 y un 25% (Sejersted y cols., 1986).

Las ratas del presente estudio presentan valores significativamente más altos de hematocrito que el grupo control, tanto a la hora y como a las 24 horas de haber finalizado el último ejercicio del entrenamiento (Figura 26). Novosadová (1977) estudió los cambios del hematocrito en individuos sanos sometidos a dos tipos de entrenamiento prolongado, uno de intensidad media (40% de  $VO_2$  máxima) y otro de intensidad submáxima (67%  $VO_2$  máxima). El resultado obtenido mostró un aumento significativo del hematocrito sólo cuando la intensidad era submáxima, alcanzando una normalización espontánea de sus valores una vez que había finalizado el entrenamiento. El hematocrito se eleva como resultado de la adaptación al entrenamiento de intensidad aeróbica progresiva, cuando implica un determinado esfuerzo (estrés) para el organismo.

El entrenamiento progresivo utilizado en este trabajo aumenta el hematocrito, lo cual indica una mejor capacidad de transporte de oxígeno por la sangre (Figura 26). Además, eleva transitoriamente el valor de la osmolaridad tras el ejercicio, recuperando los valores control en las 24 horas (Figura 28). Dichos fenómenos indican

que los mecanismos de regulación del balance hídrico responden correctamente ante los cambios generados, consiguiendo una estabilización.

El plasma contiene diferentes tipos de proteínas entre las que se incluyen proteínas simples, así como las unidas a lípidos y glúcidos, denominadas proteínas complejas. La mayor parte de estas proteínas se sintetizan en el sistema retículo-histiocitario del hígado, a excepción de las gammaglobulinas. Las proteínas plasmáticas cumplen diversas funciones, como por ejemplo el control de la distribución del líquido extracelular, el soporte y vehículo de sustancias (hormonas, vitaminas, lípidos), intervienen en la coagulación sanguínea y en la defensa del organismo (anticuerpos). Los valores normales de concentración de proteína plasmática en sangre humana son de 6-8 g/100mL (Balcell, 1993), que coinciden con los resultados obtenidos en este estudio (Figura 27). Durante el ejercicio se produce una hemoconcentración, es decir, una mayor concentración de hematíes, hemoglobina y proteínas plasmáticas (Sawka y cols., 1984). Fallon y cols., (1999) en un estudio en atletas observaron, tras un ejercicio físico intenso puntual e incluso hasta 4 días después de su finalización, aumentos significativos de las concentraciones de proteínas plasmáticas. Resultado de un incremento del flujo neto de proteínas hacía el espacio intravascular durante el ejercicio, que aumentaba considerablemente al finalizar el mismo, funcionando como un factor regulador del volumen plasmático durante el ejercicio.

Los resultados de este estudio muestran un aumento en las proteínas plasmáticas una hora después del ejercicio, que vuelve a niveles más bajos, incluso que los control, en las 24 horas después del último entrenamiento (Figura 27). Hay estudios de los índices hematológicos tras 2 días de descanso en deportistas pertenecientes a distintos niveles de competición (internacional, nacional, local, aficionado), que relacionan este descenso de la concentración de proteínas plasmáticas con la expansión del volumen plasmático descrita como adaptación al entrenamiento crónico de resistencia al que son sometidos (Schumacher y cols., 2002).

Para evaluar el estado de hidratación, además de utilizar parámetros sanguíneos, frecuentemente se utilizan parámetros renales, como por ejemplo la osmolaridad urinaria. En concreto, se ha visto que las mediciones urinarias de

osmolaridad son mejores indicadores frente a niveles moderados, no agudos, de deshidratación real o inminente, que las mediciones realizadas en sangre, como el hematocrito o la osmolaridad plasmática (Armstrong y cols., 1994; Walsh y cols., 1994; Popowski y cols., 2001). No obstante, la osmolaridad urinaria muestra con cierto retraso, los cambios de osmolaridad que ocurren en el plasma durante la deshidratación aguda, de una duración de menos de 4 horas y donde la pérdida de líquidos es del 5% del peso corporal (Francesconi y cols., 1987).

En este trabajo no se encontraron diferencias en los valores de osmolaridad urinaria entre los grupos control y Pre-test1, resultados esperables ya las ratas de ambos grupos aún no han realizado ejercicio. Pero hay un aumento significativo de la osmolaridad en el grupo Post-test4 respecto al grupo Pre-test1 (Figura 29), es decir, las ratas experimentan un aumento de la osmolaridad urinaria tras realizar el ejercicio.

Si se analiza la osmolaridad urinaria fraccionada (Figura 30), recogida en 6 periodos de 4 horas cada uno, se observan valores significativamente mayores en el grupo Post-test4 respecto a los grupos control y Pre-test1, en los periodos *P1* (11-15h), *P2* (15-19h), *P3* (19-23h) y *P4* (23-03h). Esta diferencia va disminuyendo a lo largo de los periodos posteriores, hasta alcanzar valores similares en los tres grupos de estudio. Además el entrenamiento podría tener un efecto regulador de la osmolaridad urinaria, como se puede observar en los resultados Post-test4 (Figura 31.C), donde hay una menor variabilidad de los datos (menor desviación típica como medida de dispersión) dentro de cada periodo de recogida de muestras, que la observada en los control (Figura 31.A) y Pre-test1 (Figura 31.B). El valor mínimo de osmolaridad se obtiene en el periodo *P1* (11-15h), tanto para el grupo control como para el Pre-test1, mientras que para el grupo Post-test4 se da en el periodo *P6* (07-11h) (Figuras 30 y 31). El flujo sanguíneo renal regulado en parte por el sistema nervioso autónomo, suele ser menor durante el ejercicio y hasta una hora después de realizado, y la magnitud de esa disminución se relaciona con la intensidad del ejercicio y con el grado de agotamiento producido (Poortmans y Vanderstraeten, 1994). Por lo tanto, los resultados obtenidos señalan que la intensidad del ejercicio aquí utilizado produce un aumento de la osmolaridad urinaria, cuyo valor más alto ocurre en el periodo *P2* (15-19h), que se mantiene elevado hasta el periodo *P4* (23-03h). La osmolaridad permanece elevada

aproximadamente desde las 4 horas, tras finalizar el último ejercicio (Post-test4), manteniéndose hasta 16 horas, después de las cuales sus valores comienzan a normalizarse.

### **5.5.2.- Actividad neuronal**

Desde hace más de veinte años, se viene considerando a la actividad del gen c-fos y a su producto, la proteína c-Fos, marcadores fiables de actividad neuronal localizada en los circuitos del sistema nervioso central, como respuesta a señales estresantes (Hoffman y cols., 1993; Kovacs, 2002). En el presente trabajo para analizar los efectos del entrenamiento sobre la actividad neuronal, se cuantifica la actividad c-fos en determinadas regiones hipotalámicas implicadas en la homeostasia hidromineral (Cullinan y cols., 1995, 1996; Johnson y Thunhorst, 1997; Antunes-Rodrigues y cols., 2004).

El núcleo paraventricular (PVN) se encuentra localizado en una región hipotalámica que juega un papel determinante cuando el organismo se ve sometido a situaciones de estrés físico (Swanson y Kuypers, 1980; Swanson y Sawchenko, 1983). Resulta notable en el presente estudio el aumento de la actividad c-fos en las células del PVN tras una hora después de finalizar el ejercicio, disminuyendo en las 24 horas siguientes, e igualándose con el control (Figuras 32 y 36). En experimentos con ratas sometidas a ejercicio voluntario en una rueda o bien forzadas a correr en un tapiz rodante, tras uniformizar la cantidad de trabajo realizada en una hora, se observó un mayor número de células parvocelulares c-fos inmunopositivas en el PVN bajo ejercicio forzado que bajo ejercicio voluntario, y en ambos casos siempre superior al número encontrando en el grupo control (Yanagita y cols., 2006). Las células parvocelulares del PVN participan en la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal estimulando el metabolismo glucolítico, la síntesis y la liberación de CRH y AVP (Croiset y cols., 2000; Carrasco y Van de Kar, 2003; Antunes-Rodrigues y cols., 2004). Esto provoca la secreción de adrenalina y cortisol desde las glándulas adrenales (Scheurink y cols., 1989; Antoni y cols., 1991), por vía simpática (vía intermediolateral; Strack y cols., 1989) y por vía humoral (ACTH sanguíneo; Galbo, 1992).

Por una parte, la estimulación eléctrica de los nervios renales, tiene varios efectos, como liberación de noradrenalina, vasoconstricción, antinatriuresis y secreción de renina (Yamaguchi y cols., 2000). DiBona (2000) ha demostrado que un aumento en la actividad renal simpática va a la par con un incremento de reabsorción de agua y de sodio en el túbulo renal. Por otra parte, por vía humoral se sabe que son necesarios niveles basales de glucocorticoides para una función renal normal (Ganong, 2005). Además también se conoce que la ACTH estimula el apetito por la sal en ratas (Weisinger y cols., 1978) y ratones (Denton y cols., 1999). A la vista de estos resultados, estas respuestas del organismo frente a las hormonas del estrés funcionan como mecanismo protector o de prevención ante posibles desequilibrios electrolíticos.

Los animales del presente trabajo, al finalizar el ejercicio, aún se encuentran estresados y los mecanismos de regulación permanecen activados para compensar las posibles variaciones homeostáticas debidas a la actividad física, en este caso forzada. A las 24 horas el número de células c-fos inmunopositivas es similar al observado en las ratas control, indicando una correcta recuperación (Figura 32).

Por otro lado se puede observar como aparece una acumulación de células c-fos inmunopositivas en las muestras de una hora tras el ejercicio en la región del núcleo supraóptico (SON) (Figura 33 y 37). Descubrimientos previos corroboran como las neuronas vasopresinérgicas pueden activarse en el SON pero no en el PVN magnocelular (Soya, 2001). Saito y cols. (2004; 2007) estudiaron los efectos del estrés sobre neuronas vasopresinérgicas de ratas sometidas a ejercicio sobre tapiz rodante. Las habituaron durante 10 días a correr sobre el tapiz y posteriormente las sometieron a un ejercicio de 30 minutos, unas a una intensidad por debajo del umbral de lactato (LT, 15 m/min) y otras a una intensidad superior (supra-LT, 25 m/min). Sólo se observó un incremento de la actividad c-fos en el hipotálamo de ratas supra-LT, concretamente en las células parvocelulares del PVN y en las magnocelulares del SON, acompañado de un aumento de los niveles de ACTH y de la osmolaridad plasmática. Esto no ocurría ni en el grupo control ni en el grupo que trabajaba por debajo del umbral del lactato. Estos resultados podrían deberse a que ambas regiones (parvocelular y magnocelular) del PVN tienen diferente umbral de activación. Hay hallazgos que muestran que tras una actividad de intensidad alta, forzada y de corta duración, la expresión c-fos en el

PVN magnocelular era más evidente a las 2 horas de haber finalizado el ejercicio, mientras que en la zona parvocelular, el pico de células c-fos inmunopositivas tenía lugar a los 30 minutos (Cullinan y cols., 1995). Las neuronas magnocelulares del SON, muestran una sensibilidad mayor hacia varios estímulos (hemorragia, hipotensión,...) que el PVN magnocelular (Roberts y cols., 1993). Esto parece indicar que las neuronas magnocelulares del PVN serían activadas con un ejercicio de mayor intensidad y más tardíamente que las neuronas parvocelulares del PVN y las magnocelulares del SON, lo que explica los resultados obtenidos en nuestro estudio (Figuras 32 y 33).

Además de lo anteriormente descrito, hemos encontrado actividad c-fos inmunopositiva en otras regiones hipotalámicas: en el núcleo supraquiasmático (SQ) y en el núcleo subfornical (SFO). El SQ, denominado también marcapasos circadiano, es importante para la sincronización de los ritmos circadianos de actividad locomotora (Tavakoli -Nezhad y Schwartz, 2006). Estudios en ratones señalan que durante el ejercicio físico, la serotonina del SQ es una de las señales necesarias para la sincronización de los ritmos circadianos durante el ejercicio (Marchant y cols., 1997), además parece que alguno de los tipos de receptores serotoninérgicos están implicados en la secreción de AVP (Coiro y cols., 2010). Se cree que la proteína c-fos, actuando junto con otros factores de transcripción, está involucrada en los reajustes de los ritmos circadianos inducidos por la luz (Guido y cols., 1999). Schwartz y cols., (2004) han descrito el ritmo endógeno de la actividad c-fos en el SQ de ratas. En su trabajo describieron como el número de células c-fos inmunopositivas alcanzaba su punto máximo por la mañana (en las primeras horas de luz), seguido de un descenso hasta llegar a un número que se mantenía estable hasta la fase de oscuridad, donde se registraba el mínimo.

El estímulo del ejercicio (y el sacrificio y recogida de muestras) del presente estudio, se realizó al final de la fase de luz, cuando los animales están más activos, ya que en estos roedores el período de inactividad se produce durante las horas de luz. Por eso nuestros controles, aún no estando sometidos a ningún tipo de estrés intencionado, presentan actividad c-fos positiva, coincidiendo así con el patrón de activación c-fos en el SQ al final de la fase de luz (Figuras 34 y 38). En animales forzados a nadar o a permanecer inmóviles en un cilindro durante 10 minutos se midió



la expresión del RNA de la proteína c-fos en diferentes estructuras cerebrales (telencéfalo, diencefalo, médula espinal, tronco del encéfalo y cerebelo), antes (control) y a los 30 minutos de realizar el ejercicio o de permanecer inmóviles. Se observó que las células del SQ expresaban niveles de c-fos similares tras las dos situaciones estresantes y ligeramente superiores a los de los animales control (Cullinan y cols., 1995).

Los resultados de nuestro estudio tampoco muestran diferencias significativas en la actividad c-fos del SQ entre los grupos experimentales y el control (Figuras 34 y 38). Esto indica que el entrenamiento utilizado en este trabajo no parece generar un estrés lo suficientemente importante para producir alteraciones significativas en la actividad c-fos del SQ, ya que no aparecen diferencias entre el grupo de animales entrenados respecto a los no entrenados.

Por su lado, el SFO también actúa como un osmorreceptor que provoca la secreción de AVP por el hipotálamo (Dierickx K, 1963; Simpson y Routtenberg, 1963). Los resultados que hemos obtenido muestran que no hay diferencias importantes en la actividad c-fos entre los grupos estudiados (Figuras 35 y 39), luego el entrenamiento no afecta a la actividad del mismo o no alcanza un grado de intensidad suficiente para activarlo.

Hay estudios que muestran como las lesiones electrolíticas del SFO no previenen la activación osmótica en el PVN ni en el SON, lo que sugiere que estas zonas pueden ser activadas por el estrés osmótico por otras vías no dependientes de la información recibida desde el SFO (Giovannelli y Bloom, 1992). Starbuck y Fitts (2002) confirman este hecho, ya que observan que en respuesta a una dosis media de solución hipertónica salina intragástrica (0,5 % del peso corporal de NaCl 0,6M), la inmunoreactividad c-fos está ausente en el SFO, mientras que se expresa correctamente en el SON y en el PVN. Esto señala cómo estas zonas del hipotálamo pueden verse activadas antes que el SFO, porque probablemente sus umbrales de activación sean menores. En dicha investigación después de una carga intragástrica de una solución salina 0,6 M, las fibras que conectan el SFO y el hipotálamo fueron seccionadas para comprobar si la inmunoreactividad c-fos era positiva en ambos

núcleos. La inmunorreactividad c-fos en el SFO no fue significativamente elevada ni en las ratas control ni en los animales operados, sin embargo, sí lo fue en el SON y PVN, si bien la expresión en los animales operados fue de un 30-50% menor que en los animales control. La conectividad entre el SFO y el hipotálamo resulta por lo tanto crítica para la expresión total de c-fos en el hipotálamo después de una carga moderada de solución salina, incluso cuando el SFO por sí mismo aún no ha expresado inmunorreactividad c-fos. Estos estudios apoyan nuestros resultados, donde el entrenamiento parece no afectar a la actividad c-fos del mismo, mientras que sí lo hace en el PVN y en el SON (Figuras 32 y 33).

El modelo de entrenamiento de intensidad progresiva de este trabajo, mostró una hora tras finalizar el ejercicio un desequilibrio transitorio de la actividad neuronal (c-fos celular) en el PVN y en el SON, y de las variables fisiológicas estudiadas relacionadas con la regulación del balance hídrico; que tras 24 horas volvieron a niveles basales, indicando una correcta recuperación.

Estudios más profundos de la respuesta del sistema nervioso autónomo y de variables bioquímicas relacionadas con la regulación hidromineral, podrían proporcionar mejores estrategias para mantener y restaurar la homeostasis de los fluidos corporales, y así poder prevenir posibles efectos negativos sobre la salud.

**CONCLUSIONES**







1. La producción de melatonina por la glándula pineal se vio afectada por el esfuerzo físico realizado durante el programa de entrenamiento tanto en nadadores como en piragüistas.
2. La carga del entrenamiento afectó a la síntesis de melatonina de los nadadores, como se deduce de sus valores diurnos y nocturnos, que mostraron una producción máxima de 6-sulfatoximelatonina ( $\alpha$ MT6S) durante el Macro ciclo II como consecuencia de la elevada carga de trabajo a la que fueron sometidos; y una producción diurna de  $\alpha$ MT6S mínima durante el Entrenamiento básico o aeróbico, donde la carga fue mucho menor.
3. En los piragüistas, cuyo programa de entrenamiento tiene un componente importante de fuerza o anaeróbico, los valores de  $\alpha$ MT6S al final del día fueron similares en todas las fases del entrenamiento. La mayor producción nocturna de  $\alpha$ MT6S fue en el Inicio de temporada, como resultado de la adaptación del organismo al programa del entrenamiento tras un periodo de descanso.
4. La excreción urinaria de citrato, mostró siempre una recuperación metabólica del mismo durante el descanso nocturno. Esta recuperación se vio afectada por la intensidad del entrenamiento en nadadores y en piragüistas.
5. Durante el programa de entrenamiento en nadadores, la producción total de citrato disminuyó en paralelo a la progresiva adaptación del organismo al entrenamiento aeróbico (hasta el Macro ciclo I), indicando una mejor capacidad oxidativa.
6. Durante el programa de entrenamiento en piragüistas, la producción total de citrato fue muy similar en todas las fases estudiadas debido a las adaptaciones a un programa de entrenamiento de carga anaeróbica importante.
7. La valoración de  $\alpha$ MT6S y citrato en orina, abre la posibilidad de tener un marcador del nivel de estrés y un indicador de recuperación metabólica tras la carga de trabajo del entrenamiento, utilizando métodos simples y no invasivos.

8. El patrón de excreción urinaria de citrato en ratas tras un entrenamiento de intensidad progresiva, expuesto por primera vez en este estudio, mostró niveles aumentados tras 4 horas de finalizar el último ejercicio, persistiendo elevados hasta 16 horas después.
9. El modelo de entrenamiento de intensidad progresiva en ratas, aumentó la actividad enzimática mitocondrial citrato sintasa (CS) una hora tras la finalización del ejercicio, en los músculos sóleo y gastrocnemio; lo que indica que esta actividad física incrementó la capacidad oxidativa de los mismos.
10. La actividad CS en músculos sóleo y gastrocnemio a las 24 horas de finalizar el último entrenamiento es menor que la del grupo control, reflejando que el gran gasto oxidativo afectó a la fase de recuperación, experimentando los músculos los efectos de sobrecompensación tras el ejercicio.
11. El modelo de entrenamiento de intensidad progresiva produjo un desequilibrio del balance hídrico una hora tras finalizar el ejercicio, aumentando los valores del hematocrito, proteínas totales y osmolaridad plasmáticas; además de producir un incremento de la ingesta de líquidos, volviendo 24 horas después a niveles basales. El ejercicio también produjo un aumento de la osmolaridad urinaria, cuyo valor más alto fue a las 4 horas de finalizar el último ejercicio, persistiendo elevada hasta 16 horas después.
12. El programa de entrenamiento con incremento de carga progresiva indujo una respuesta al estrés que se reflejó en un incremento en la actividad c-fos celular una hora tras finalizar el último ejercicio, en el núcleo paraventricular (PVN) y en el núcleo supraóptico (SON), núcleos implicados en la regulación del balance hídrico y en la respuesta neuroendocrina ante estímulos estresantes. Veinticuatro horas tras el ejercicio, el número de células c-fos inmunopositivas es similar al observado en las ratas control, indicando una correcta recuperación.



13. Los resultados en el número de células c-fos inmunopositivas en el núcleo subfornical (SFO) no muestran diferencias significativas entre los grupos estudiados. El desequilibrio hídrico producido por la carga del entrenamiento no fue suficiente para activarlo.
14. El entrenamiento aplicado en este trabajo no produjo alteraciones en la actividad c-fos del núcleo supraquiasmático (SQ), núcleo hipotalámico importante para la sincronización de los ritmos circadianos durante el ejercicio. No apareciendo diferencias entre el grupo de animales entrenados respecto a los no entrenados.





## **BIBLIOGRAFÍA**





- Adachi A, Nijima A, Jacobs HL. An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioural studies. *Am J Physiol*; 231(4): 1043-1049, 1976.
- Adachi, A. Thermosensitive and osmoreceptive afferent fibers in the hepatic branch of the vagus nerve. *J Auton Nerv Syst*; 10(3-4): 269- 273, 1994.
- Aldhous ME, Arendt J. Radioimmunoassay for 6-sulphatoxymelatonin in urine using an iodinated tracer. *Ann Clin Biochem*; 25 (3): 298-303, 1988.
- Alexander S, Irvine C, Ellis M, Donald R. The effect of acute exercise on the secretion of corticotrophin release factor, arginine vasopressin and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse. *Endocrinology*; 128(1): 65-72, 1991.
- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev*; 88(1): 287-332, 2008.
- Andersson B, Jobin M, Olsson K. Stimulation of urinary salt excretion following injections of hypertonic NaCl-solution into the 3<sup>rd</sup> ventricle. *Acta Physiol Scand*; 67(1): 127-128, 1966.
- Andersson B, McCann SM. Drinking, antidiuresis and milk ejection from electrical stimulation within the hypothalamus of the goat. *Acta Physiol Scand*; 35(2): 312-320, 1955.
- Andersson B, McCann SM. Effect of hypothalamic lesions on water intake of dog. *Acta Physiol Scand* 35(3-4): 313-320, 1956.
- Andersson B. Regulation of body fluids. *Annu Rev Physiol*; 39: 185-200, 1977.
- Andersson H, Karlsen A, Blomhoff R, Raastad T, Kadi F. Plasma antioxidant responses and oxidative stress following a soccer game in elite female players. *Scand J Med Sci Sports*; 20(4): 600- 608, 2010.
- Antoni FA, Irvine CH, Ellis MJ, Donald RA. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev*; 128(1): 65-72, 1991.

- Antunes-Rodrigues J, De Castro M, Elias LLK, ValenÇa MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body Fluid Metabolism. *Physiol Rev*; 84(1): 169-208, 2004.
- Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Chemical stimulation of water, sodium chloride and food intake by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third ventricle. *Proc Soc Exp Biol Med*; 133(4): 1464-1470, 1970.
- Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrinol*; 29(2): 205-229, 1988.
- Arendt J, Bojkowski C, Folkard S, Franey C, Marks V, Minors D, Waterhouse J, Wever RA, Wildgruber C, Wright J. Some effects of melatonin and control of its secretion in humans. *Ciba Found Symp*; 117: 266-283, 1985.
- Armstrong LE, Maresh CM, Castellani JW. Urinary indices of hydration status. *Int J Sport Nutr*; 4(3): 265-279, 1994.
- Armstrong WE. Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. *Prog Neurobiol*; 47(4-5): 291-339, 1995.
- Arratibel I, Córdoba A. Valoración metabólica. Págs. 99-109. En: *La fatiga muscular en el entrenamiento deportivo*. Coordinador Córdoba A. Editorial Síntesis, 1ª Ed., 1997.
- Atkinson G, Drust B, Reilly T, Waterhouse J. The relevance of melatonin to sports medicine and science. *Sports Medicine*; 33(11): 809-831, 2003.
- Axelrod J, Shein HM, Wurtman RJ. Stimulation of 14C-melatonin synthesis from 14C-tryptophan by noradrenaline in rat pineal in organ culture. *Proc Natl Acad Sci USA*; 62: 544-549, 1969.
- Axelrod J, Weissbach H. Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. *J Biol Chem*; 236: 211-213, 1961.
- Balcells A. *La clínica y el laboratorio*. Editorial Masson, 16ª Ed., 1993.
- Balsom PD, Seger JY, Sjödín B, Ekblom B. Maximal-intensity intermittent exercise: effect of recovery duration. *Int J Sports Med*; 13(7): 528-533, 1992.



- Baltaci AK, Cumraligil B, Kilic M, Kaya O. Effect of swimming exercise on lactate levels and its relation with zinc in pinealectomized rats. *Cell Biochem Funct*; 25(6): 597-601, 2007.
- Barger LK, Wrigth KP, Hughes RJ, Czeiser CA. Daily exercise facilitates phase delays of circadian melatonin rhythm in very dim light. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 286(6): 1077- 1084, 2004.
- Barnett C, Carey M, Proietto J, Cerin E, Febbraio MA, Jenkins D. Muscle metabolism during sprint exercise in man: influence of sprint training. *J Sci Med Sport*; 7(3): 314-322, 2004.
- Barr SI. Effects of dehydration on exercise performance. *Can J Appl Physiol*; 24(2): 164-172, 1999.
- Bellido Guerrero B, de Luis Román DA. Manual de nutrición y metabolismo. Editorial Díaz de Santos, 2006.
- Betik AC, Baker DJ, Krause DJ, McConkey MJ, Hepple RT. Exercise training in late middle aged male F344BN rats improves skeletal muscle aerobic function. *Exp Physiol*; 93(7): 863-871, 2008.
- Bisset GW, Chowdrey HS. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol*; 73(6): 811-872, 1988.
- Blackburn RE, Demko AD, Hoffman GE, Striker EM, Verbalis JG. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 263(6-2): 1347-1353, 1992.
- Blair-West JR, Denton DA, McBurnie MI, Weisinger RS. The effect of adrenocorticotrophic hormone on water intake in mice. *Physiol Behav*; 60(4): 1053-1056, 1996.
- Bojkowski CJ, Arendt J, Shih MC, Markey SP. Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatoxymelatonin. *Clin Chem*; 33(8): 1343-1348, 1987.

- Bojkowski CJ, Arendt J. Annual changes in 6-sulfatoxymelatonin excretion in man. *Acta Endocrinol (Copenh)*; 117: 470-476, 1988.
- Bompa TO. *Periodization: Theory and methodology of training*. Editorial Human Kinetics Publishers, 4ª Ed., 1999.
- Bordenave S, Metz L, Flavier S, Lambert K, Ghanassia E, Dupuy AM, Michel F, Puech-Cathala AM, Raynaud E, Brun JF, Mercier J. Training-induced improvement in lipid oxidation in type 2 diabetes mellitus is related to alterations in muscle mitochondrial activity. Effect of endurance training in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*; 34(2): 162-168, 2008.
- Borges-Silva C, Takada J, Alonso-Vale MI, Peres SI, Fonseca-Alaniz MH, Andreotti S, Cipolla-Neto J, Phiton-Curi TC, Lima FB. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. *J Pineal Res*; 43: 96-103, 2007.
- Bourque CW, Oliet SH, Richard D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol*; 15(3): 231-274, 1994.
- Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nature Rev*; 9(7): 519-531, 2008.
- Brimble MJ, Dyball RE. Characterization of the responses of oxytocin- and vasopressin-secreting neurons in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. *J Physiol*; 271(1): 253-271, 1977.
- Briski K, Gillen E. Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. *Brain Res Bull*; 55(3): 401-408, 2001.
- Brooks GA, Fahey T (Editor). *Exercise physiology*. Pág. 338. En: *Human Bioenergetics and Its Application*. Editorial New York: Mcmillan, 1984.
- Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science*; 207(4429): 373-378, 1980.

- Bruce J, Tamarkin L, Riedel C, Markey S, Oldfield E. Sequential cerebrospinal fluid and plasma sampling in humans: 24-hour melatonin measurements in normal subjects and after peripheral sympathectomy. *J Clin Endocrinol Metab*; 72(4): 819-823, 1991.
- Burgomaster KA, Hughes SC, Heigenhauser GJ, Bradwell SN, Gibala MJ. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. *J Appl Physiol*; 98(6): 1985-1990, 2005.
- Buxton OM, Lhermite Baleriaux M, Hirschfield U, Cauter E. Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion. *J Biol Rhythms*; 12(6): 568-574, 1997.
- Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology*; 91(5): 1213-1218, 1972.
- Cardinali DP, Vacas MI, Rosenstein RE, Etchegoyen GS, Keller MI, González C, Pereyra EN. Págs. 51-66. Multifactorial control of pineal melatonin synthesis: analysis through binding studies. *Adv in Pineal Res*: Reiter RJ, Fraschini F eds., John Libbey y Co. Ltd, 1987.
- Carlson SH, Beitz A, Osborn JW. Intra-gastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am J Physiol*; 272(3-2): 750-758, 1997.
- Carr DB, Reppert S, Bullen B, Skrinar G, Beitins I, Arnold M., Rosenblatt M, Martin JB, McArthur JW. Plasma melatonin increases with exercise. *Clin J Endocrinol Metab*; 53(1): 224-225, 1981.
- Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*; 463(1-3): 235-272, 2003.
- Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*; 100(2): 126-131, 1985.

- Champey TH, Steger RW, Christie DS, Reiter RJ. Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res*; 338(17): 25-32, 1985.
- Choi-Kwon S, Baerschi AJ. Splanchnic osmosensation and vasopressin: mechanisms and neural pathways; *Am J Physiol*; 261(1-1): 18-25, 1991.
- Coiro V, Maffei ML, Volta E, Cataldo S, Minelli R, Vacca P, Volpi R, Chiodera P. Effect of serotonergic system on AVP secretion induced by physical exercise. *Neuropeptides*; 44(1): 53-56, 2010.
- Convertino VA, Brock PJ, Keil LC, Bernauer EM, Greenleaf JE. Exercise training-induced hypervolemia: role of plasma albumin, rennin, and vasopressin. *J Appl Physiol*; 48(4): 665-669, 1980.
- Convertino VA, Klein LC, Greenleaf JE. Plasma volume, renin, and vasopressin responses to graded exercise after training. *J Appl Physiol*; 54(2): 508-514, 1983.
- Cook MR, Graham C, Kavet R, Stevens RG, Davis S, Kheifets L. Morning urinary assessment of nocturnal melatonin secretion in older women. *J Pineal Res*; 28(1): 41-47, 2000.
- Córdova, A. Sobreentrenamiento. Págs. 335-347. En: *La fatiga muscular en el rendimiento deportivo*. Coordinador Córdova A. Editorial Síntesis, 1ªEd., 1997.
- Costill DL, Fink WJ. Plasma volume changes following exercise and thermal dehydration. *J Appl Physiol*; 37(4): 521-525, 1974.
- Costill DL, Maglischo EW, Richardson AB. Págs. 153-163. *Natación: Aspectos biológicos y mecánicos*. Editorial Hispano Europea, 1ª Ed., 2001.
- Croiset G, Nijssen MJ, Kamphuis PJ. Role of corticotropin-releasing factor, vasopressin and autonomic nervous system in learning and memory. *Eur J Pharmacol*; 405(1-3): 225-234, 2000.
- Cullinan WE, Helmreich JR, Watson SJ. Fos expression in forebrain afferents to the hypothalamic paraventricular nucleus following swim stress. *J Comp Neurol*; 368: 88-89, 1996.

- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*; 64(2): 477-505, 1995.
- Daussin FN, Zoll J, Dufour SP, Ponsot E, Lonsdorfer-Wolf E, Doutreleau S, Mettauer B, Piquard F, Geny B, Richard R. Effect of interval versus continuous training on cardiorespiratory and mitochondrial functions: relationship to aerobic performance improvements in sedentary. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 295(1): 264-72, 2008.
- De Feo P, Di Loreto C, Lucidi P, Murdolo G, Parlanti N, De Cicco A, Piccioni F, Santeusanio F. Metabolic response to exercise. *J Endocrinol Invest*; 26(9): 851-854, 2003.
- Denton DA, Blair-West JR, McBurnie MI, Miller JA, Weisinger RE, Williams RM. Effect of adrenocorticotrophic hormone on sodium appetite in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 277(4-2): 1033-1040, 1999.
- Di Giacomo C, Acquaviva R, Sorrenti V, Vanella A, Grasso S, Barcellona ML, Galvano F, Vanella L, Renis M. Oxidative and antioxidant status in plasma of runners: effect of oral supplementation with natural antioxidants. *J Med Food*; 12(1): 145-150, 2009.
- Díaz B, Colmenero MD. Influence of physical training on the Syrian hamster's melatonin rhythm. *Neurosci Lett*; 428: 68-71, 2007.
- Díaz B, García R, Colmenero MD, Terrados N, Fernández B, Marín B. Melatonin and gonadotropin hormones in pubertad sportsgirls. *Rev Esp Fisiol*; 49(1): 17-22, 1993.
- DiBona GF. Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the rennin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension*; 36(6): 1083-1088, 2000.
- Dierickx K. The subfornical organ, a specialised osmoreceptor. *Naturwissenschaften*; 50: 163-164, 1963.

- Dooley CP, Valenzuela JE. Duodenal volume and osmoreceptor in the stimulation of human pancreatic secretion. *Gastroenterology*; 86(1): 23-27, 1984.
- Duan YF, Winters W, McCabe PM, Scheneiderman EN. Cardiorespiratory components of the defense reaction elicited from the paraventricular nucleus. *Physiol Behav* 61(2): 325-330, 1997.
- Elias AN, Wilson AF, Pandian MR, Chune G, Utsumi A, Kayaleh R, Stone SC. Corticotropin releasing hormone and gonadotropin secretion in physically active males after acute exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*; 62(3): 171-174, 1991.
- Elliot JM, Eusebio E. Calcium oxalate solubility: The effect of inorganic salts, urea, creatine and organic acids. *Investig Urol*; 3: 72-78, 1965.
- Eng R, Miselis RR. Polydipsia and abolition of angiotensin-induced drinking after transections of subfornical organ efferent projections in the rat. *Brain Res*; 225(1): 200-206, 1981.
- Epstein AN, Fitzsimons JT, Rolls BJ. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *J Physiol (Lond)*; 210(2): 457-474, 1970.
- Epstein AN, Kissileff HR, Stellar E. The Neuropsychology of thirst: new findings and advances in concepts. Editorial American Association for the Advancement of Science; 1973.
- Fallon KE, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med*; 33(4): 264-269, 1999.
- Felten DL, Shetty AL. Netter, *Atlas de neurociencia*. Editorial Elsevier Masson, 2ª Ed., 2010.
- Fitzsimons JT. Drinking caused by constriction of the inferior vena cava in the rat. *Nature*; 204: 479-480, 1964.
- Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*; 78(3): 583-686, 1998.

- Fox SI. Fisiología Humana. Editorial Mcgraw-Hill / Interamericana, 7ª Ed., 2008.
- Francesconi RP, Hubbard RW, Szlyk P, Schnakenberg D, Carlson D, Leva N, Sils I, Hubbard L, Pease V, Young J. Urinary and hematologic indexes of hypohydration. *J Appl Physiol*; 62(3): 1271-1276, 1987.
- Freund BJ, Claybaugh JR, Hashiro GM, Buono M, Chrisney S. Exaggerated ANF response to exercise in middle-aged vs. young runners. *J Appl Physiol*; 69(5): 1607-1614, 1990.
- Frisch H, Waldhauser F, Waldhor T, Mullner-Eidenbock A, Neupane P, Schweitzer K. Increase in 6-hydroxymelatonin excretion in humans during ascent to high altitudes. *J Clin Endocrinol Metab*; 89(9): 4388-4390, 2004.
- Galbo H. Exercise Physiology: humoral function. *Sport Sci Rev*; 1: 65-93, 1992.
- Ganong WF. Review of Medical Physiology. Editorial New York: McGraw-Hill, 2005.
- García R, Brime I, Cuesta I, Luna ML, Sanz P, Marín B. Fuentes energéticas de la actividad muscular. Págs. 112-127. En: *Introducción a la medicina y ciencias del deporte III. La actividad física y el deporte en la sociedad actual*. Coordinador Marín B. Editorial Universidad de Oviedo, 1997.
- Garfinkel D, Laudon M, Nof D, Zisapel N. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *Lancet*; 346: 541-544, 1995.
- Geysant A, Geelen G, Denis C, Allevard AM, Vincent M, Jarsaillon E, Bizollon CA, Lacour JR, Gharib C. Plasma vasopressin, rennin activity, and aldosterone: effect of exercise and training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*; 46(1): 21-30, 1981.
- Giovannelli L, Bloom FE. c-Fos protein expression in the subfornical organ following osmotic stimulation. *Neurosci Lett*; 139(1): 1-6, 1992.
- Godwin JT. Cytologic diagnosis of aspiration biopsies of solid or cystic tumors. *Acta Cytol*; 8(3): 206-215, 1964.

- Gollnick PD, Saltin B. Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clin Physiol*; 2(1): 1-12, 1982.
- Gómez-Carramiñana MA, Pascual E. Entrenamiento deportivo. Págs. 147-167. En: La fatiga muscular en el rendimiento deportivo. Coordinador Córdoba A. Editorial Síntesis, 1ªEd., 1997.
- González Alonso J, Mora Rodríguez R, Bedow PR, Coyle EF. Dehydration reduces cardiac output and increase system and cutaneous vascular resistance during exercise. *J Appl Physiol*; 79(5): 1487-1496, 1995.
- Goodwin TW. The metabolic roles of citrate. New Cork: Academia Press, 1968.
- Graham C, Cook MR, Kavet R, Sastre A, Smith DK. Prediction of nocturnal plasma melatonin from morning urinary measures. *J Pineal Res*; 24(4): 230-238, 1998.
- Graham JM, Rickwood D. Subcellular Fractionation: A Practical Approach. New York: Oxford Univ. Press, 1997.
- Graham JM. Biomembrane Protocols. Págs. 29-57. En: Methods in Molecular Biology Vol. 19. Graham JM and Higgins JA eds., Editorial Humana Press, 1993.
- Graham RC, Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultra-structural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*; 14(4): 291-302, 1966.
- Graham TE, Gibala MJ. Anaplerosis of tricarboxylic acid cycle in human skeletal muscle during exercise. Magnitude, sources and potential physiological significance. *Adv Exp Med Biol*; 441: 271-286, 1998.
- Grollman AP, Harrison HC, Harrison HE. The renal excretion of citrate. *J Clin Invest*; 40: 1270-1296, 1961.
- Guido ME, Goguen D, De Guido L, Robertson HA, Rusak B. Circadian and photic regulation of immediate-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*; 90(2): 555-571, 1999.
- Guyton AC, Hall JE. Fisiología médica. Editorial Elsevier Saunders, 9ªEd., 2007.



- Haberich FJ. Osmoreception in the portal circulation. *Fed Proc*; 27(5): 1137-1141, 1968.
- Hagerman FC. Energy metabolism and fuel utilization. *Med Sci Sports Exerc*; 24(9): 309-314, 1992.
- Haimov I, Laudon M, Zisapel N, Souroujon M, Nof D, Shlitner A, Herer P, Tzischinsky O, Lavie P. Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. *British Med J*; 309: 167, 1994.
- Halson SL, Jeukendrup AE. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med*; 34(14): 967-981, 2004.
- Hamamura M, Nunez DJ, Leng G, Emson PC, Kiyama H. c-fos may code for a common transcription factor within the hypothalamic neural circuits involved in osmoregulation. *Brain Res*; 572(1-2): 42-51, 1992.
- Hamm LL. Renal handling of citrate. *Kidney Intern*; 38: 728- 735, 1990.
- Hansen D, Dendale P, Jonkers RA, Beelen M, Manders RJ, Corluy L, Mullens A, Berger J, Meeusen R, van Loon LJ. Continuous low- to moderate-intensity exercise training is as effective as moderate- to high-intensity exercise training at lowering blood HbA(1c) in obese type 2 diabetes patients. *Diabetologia*; 52(9): 1789-1797, 2009.
- Hara M, Abe M, Suzuki T, Reiter RJ. Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. *Pharmacol Toxicol*; 78(5): 308-312, 1996.
- Hara M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, Nakamura N, Suzuki T, Reiter RJ, Hirata K. Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol Signals*; 6(2): 90-100, 1997.
- Hatton GI. Oxytocin and vasopressin neurones: vive la difference! *J Physiol*; 500(2): 284, 1997.
- Hayes PM, Lucas JC, Shi X. Importance of post-exercise hypotension in plasma volume restoration. *Acta Physiol Scand*; 169(2): 115-124, 2000.

- Henriksson J. Muscle fuel selection: effect of exercise and training. *Proc Nutr Soc*; 54(1): 125-138, 1995.
- Hepple RT. Skeletal muscle: microcirculatory adaptation to metabolic demand. *Med Sci Sports Exerc*; 32(1): 117-123, 2000.
- Hew-Butler T, Jordaan E, Stuempfle KJ, Speedy DB, Siegel AJ, Noakes TD, Soldin SJ, Verbalis JG. Osmotic and Nonosmotic Regulation of Arginina Vasopressin during Prolonged Endurance Exercise. *J Clin Endocrinol Metab*; 93(6): 2072-2078, 2008.
- Hoffman G, Smith M, Verbalis J. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*; 14(3): 173, 1993.
- Hoffmann ML, DenBleyker M, Smith JC, Stricker EM. Inhibition of thirst when dehydrated rats drink water or saline. *Am J Physiol*; 290(5): 1199-1207, 2006.
- Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*; 242(9): 2278-2282, 1967.
- Honda K, Negoro H, Fukuoka T, Higuchi T, Uchide K. Effect of microelectrophoretically applied acetylcholine, noradrenaline, dopamine and serotonin on the discharge of paraventricular oxytocinergic neurones in the rat. *Endocrinol Jpn*; 32(1): 127-133, 1985.
- Hood MS, Little JP, Tarnopolsky MA, Myslik F, Gibala MJ. Low-Volume Interval Training Improves Muscle Oxidative Capacity in Sedentary Adults. *Med Sci Sports Exerc*, 2011. En prensa.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*; 75 (5): 734-738, 1981.

- Iaia FM, Hellsten Y, Nielsen JJ, Fernström M, Sahlin K, Bangsbo J. Four weeks of speed endurance training reduces energy expenditure during exercise and maintains muscle oxidative capacity despite a reduction in training volume. *J Appl Physiol*; 106(1): 73-80, 2009.
- Inder WJ, Swanney MP, Donald RA, Prickett TC, Hellems J. The effect of glycerol and dEEMopressin on exercise performance and hydration in triathletes. *Med Sci Sports Exerc*; 30(8): 1263-1269, 1998.
- Issekutz B, Miller HI, Paul P, Rodahl K. Aerobic work capacity and plasma FFA turnover. *J of Appl Physiol*; 20: 293-296, 1965.
- Jansson E, Kaijser L. Substrate utilization and enzymes in skeletal muscle of extremely endurance-trained men. *J Appl Physiol*; 62(3): 999-1005, 1987.
- Johnson AK, Thunhorst RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol*; 18(3): 292-353, 1997.
- Johnson AK. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. *Med Sci Sports Exerc*; 39(8): 1388-1400, 2007.
- Joshi BN, Troiani ME, Milin J, Nürnberger F, Reiter RJ. Adrenal-mediated depression in N-acetyltransferase activity and melatonin levels in the rat pineal gland. *Life Sci*; 38(17): 15-80, 1986.
- Kaya O, Gokdemir K, Kilic M, Baltaci AK. Melatonin supplementation to rats subjected to acute swimming exercise: Its effect on plasma lactate levels and relation to zinc. *Neuro Endocrinol Lett*; 27(1-2): 263-266, 2006.
- Kaya O, Kilic M, Celik I, Baltaci AK, Mogulkoc R. Effect of melatonin supplementation on plasma glucose and liver glycogen levels in rats subjected to acute swimming exercise. *Pak J Pharm Sci*; 23(3): 241-244, 2010.
- Kim JS, Hinchcliff KW, Yamaguchi M, Beard LA, Markert CD, Devor ST. Exercise training increases oxidative capacity and attenuates exercise-induced ultrastructural damage in skeletal muscle of aged horses. *J Appl Physiol*; 98(1): 334-342, 2005.

- Kimber NE, Heigenhauser GJ, Spriet LL, Dyck DJ. Skeletal muscle fat and carbohydrate metabolism during recovery from glycogen-depleting exercise in humans. *J Physiol*; 548(3): 919-927, 2003.
- Kirkendall DT, Garrett WE Jr. The effects of aging and training on skeletal muscle. *Am J Sports Med*; 26(4): 598-602, 1998.
- Klein DC, Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase activity and melatonin levels in the rat pineal gland. *Science*; 169(950): 1093-1095, 1970.
- Knight JA, Thompson S, Raboud JM, Hoffman BR. Light and exercise and melatonin production in women. *Am J Epidemiol*; 162(11): 1114-1122, 2005.
- Kopin IJ, Pare CMB, Axelrod J, Weissbach H. The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem*; 236: 3072-3075, 1961.
- Kovács J, Brodner W, Kirchlechner V, Arif T, Waldhauser F. Measurement of urinary melatonin: a useful tool for monitoring serum melatonin after its oral administration. *J Clin Endocrinol Metab*; 85(2): 666-670, 2000.
- Kovaks EM, Schamahl RM, Senden JM, Brouns F. Effect of high and low of fluid intake on post-exercise rehydration. *Int J Sport Nut Exerc Metab*; 12(1): 14-23, 2002.
- Krebs HA, Johnson WA. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. Págs. 148-156. En: *Bioquímica Stryer*, volumen 4. Editorial Reverté S.A., 3ª Ed., 1988.
- Kuramochi G, Kobayashi I. Regulation of the urine concentration mechanism by the oropharyngeal afferent pathway in man. *Am J Nephrol*; 20(1): 42-47, 2000.
- Langraf R, Malkinson T, Horn T, Veale WL, Lederis k, Pittman QJ. Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular nucleus stimulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 258(1-2): 155-159, 1990.

- Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R, De-Castro CB, Curi R, Pithon-Curi TC. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res*; 21(3): 751-756, 2007.
- Leng G, Brown CH, Russel JA. Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Prog Neurobiol*; 57(6): 625-655, 1999.
- Leone RM, Silman RE. Melatonin can be differentially metabolized in the rat to produce N-acetylserotonin in addition to 6-hydroxymelatonin. *Endocrinology*; 114(5): 1825- 1832, 1984.
- Lerner AB, Case JD, Mori W, Wright MR. Melatonin in peripheral nerve. *Nature*; 183: 1821, 1959.
- Little JP, Safdar AS, Wilkin GP, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. A practical model of low volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol*; 588(6): 1011-1022, 2010.
- López- Chicharro JL, Fernández-Vaquero A. *Fisiología del ejercicio*. Editorial Panamericana, 3ªEd., 2006.
- Lucía A, Díaz B, Hoyos J, Fernández C, Villa G, Bandrés F, Chicharro JL. Hormonal levels of world class cyclists during the Tour of Spain stage race. *Br J Sports Med*; 35(6): 424- 430, 2001.
- Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ. Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc Natl Acad Sci. USA*; 70(6): 1704-1707, 1973.
- Lynch HJ, Ho M, Wurtman RJ. The adrenal medulla may mediate the increase in pineal melatonin synthesis induced by stress, but not that caused by exposure to darkness. *J Neural Transm*; 40(2): 87-97, 1977.
- Lynch HJ, Hsuan M, Wurtman RJ. Sympathetic neural control of indoleamine metabolism in the rat pineal gland. *Adv Exp Med Biol*; 54: 93-114, 1975.

- Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*; 25(3): 177-195, 2004.
- Mahlberg R, Tilmann A, Salewski L, Kunz D. Normative data on the daily profile of urinary 6-sulfatoxymelatonin in healthy subjects between the ages of 20 and 84. *Psychoneuroendocrinology*; 31(5): 634-641, 2006.
- Marchant EG, Watson NV, Mistlberger RE. Both neuropeptide Y and serotonin are necessary for entrainment of circadian rhythms in mice by daily treadmill running schedules. *J Neurosci*; 17(20): 7974-7987, 1997.
- Marín Fernández B, Brime Casanueva JI, García Miranda R, López-Sela Meléndez de Arvás P. Sobreentrenamiento. Págs. 156-174. En: *Olimpismo y Medicina Deportiva*. Marcos Becerro JF, Santonja Gómez R. Editor Santonja R, 1996.
- Markey SP, Higa S, Shih M, Danforth DN, Tamarkin L. The correlation between human plasma melatonin levels and urinary 6-hydroxymelatonin excretion. *Clin Chim Acta*; 150(3): 221-225, 1985.
- Marrin K, Drust B, Gregson W, Morris CJ, Chester N, Atkinson G. Diurnal variation in the salivary melatonin responses to exercise: relation to exercise-mediated tachycardia. *Eur J Appl Physiol*, 2011. En prensa.
- Mazepa RC, Cuevas MJ, Collado PS, González-Gallego J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rat. *Life Sci*; 66(2): 153-160, 2000.
- McArdle WD. *Fundamentos de Fisiología del Ejercicio*. Editorial Mcgraw-Hill / Interamericana, 2ª Ed., 2004.
- McGowan CM, Golland LC, Evans DL, Hodgson DR, Rose RJ. Effects of prolonged training, overtraining and detraining on skeletal muscle metabolites and enzymes. *Equine Vet J Suppl*; (34): 257-263, 2002.

- McKenzie S, Phillips SM, Carter SL, Lowther S, Gibala MJ, Tarnopolsky MA. Endurance exercise training attenuates leucine oxidation and BCOAD activation during exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 278(4): 580-587, 2000.
- McKinley MJ, Hards DK, Oldfield BJ. Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing. *Brain Res*; 653(1-2): 305-314, 1994.
- McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci*; 19: 1-6, 2004.
- McKinley MJ, Mathai ML, Pennington G, Rundgren M, Vivas L. Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. *Am J Physiol*; 276(3-2): 673-683, 1999.
- Mendelsohn FAO, Allen AM, Chai SY, McKinley MJ, Oldfield BJ, Paxinos G. The brain angiotensin system: insight from mapping its components. *Trends Endocrinol Metab*; 1(4): 189-198, 1990.
- Merry TL, Ainslie PN, Walker R, Cotter JD. Fitness alters fluid regulatory but not behavioural responses to hypohydrated exercise. *Physiol Behav*; 95(3): 348-352, 2008.
- Middleton B. Measurement of melatonin and 6-sulphatoxymelatonin. *Methods Mol Biol*; 324: 235-254, 2006.
- Miyata S, Nakashima T, Kiyohara T. Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations. *Neurosci Lett*; 175(1-2): 63-66, 1994.
- Monod H, Garcin M. Use of physiological criteria for improving physical work conditions. *J Hum Ergol (Tokio)*; 25(1): 29-38, 1996.
- Monteleone P, Maj M, Fusco M, Orazzo C, Kemali D. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. *Life Sci*; 47: 1989-1995, 1990.

- Monteleone P, Fuschino A, Nolfi G y Maj M. Temporal relationship between melatonin and cortisol responses to nighttime physical stress in humans. *Psychoneuroendocrinology*; 17: 81-86, 1992a.
- Monteleone P, Maj M, Fuschino A, Kemali D. Physical stress in the middle of the dark phase does not affect light-depressed plasma melatonin levels in humans. *Neuroendocrinology*; 55(4): 367-371, 1992b.
- Moore RY. The innervations of the mammalian pineal gland. *Prog Reprod Biol*; 4: 1-29, 1978.
- Morehouse LE. Heart-controlled ergometry in cardiovascular stress testing. *J Occup Med*; 10(11): 655-662, 1968.
- Morton DJ, Reiter RJ, Buzzell GR. Swimming-induced suppression of rat pineal melatonin is prevented by pretreatment with calcium channel blockers (42836). *P.S.E.B.M*; 190, 1989.
- Mudambo KS, Coutie W, Rennie MJ. Plasma arginine vasopressin, atrial natriuretic peptide responses to long-term field training in the heat: effects of fluid ingestion and acclimatization. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*; 75(3): 219-225, 1997.
- Mudge G, Weiner I. Agents affecting volume and composition of body fluids. Págs. 682-707. En: Goodman Gilman A, Rall T, Nies A, Taylor P, eds. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Elmsford, NY: Pergamon Press, 1990.
- Nehlman MA, Hanson RW. Págs. 546-600. Energy metabolism in the regulation of metabolic processes in mitochondria. New York Academy Press, 1972.
- Nowak R, McMillen IC, Redman J, Short RV. The correlation between serum and salivary melatonin concentrations and urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion rates: two non-invasive techniques for monitoring human circadian rhythmicity. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 27(4): 445-452, 1987.



- Novosadová J. The changes in hematocrit, hemoglobin, plasma volume and proteins during and after different types of exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*; 36(3): 223-230, 1977.
- Ochoa JJ, Díaz-Castro J, Kajarabille N, García C, Guisado IM, De Teresa C, Guisado R. Melatonin supplementation ameliorates oxidative stress and inflammatory signaling induced by strenuous exercise in adult human males. *J Pineal Res*, 2011. En prensa.
- Pääkkönen T, Mäkinen TM, Leppäluoto J, Vakkuri O, Rintamäki H, Palinkas LA, Hassi J. Urinary melatonin: a noninvasive method to follow human pineal function as studied in three experimental conditions. *J Pineal Res*; 40(2): 110-115, 2006.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain*. San Diego: Academic Press, 1998.
- Pensyl CD, Benjamin WJ. Vapor pressure osmometry: minimum sample microvolumes. *Acta Ophthalmol Scand*; 77(1): 27-30, 1999.
- Pérez Casas A, Bengoechea ME. *Morfología, estructura y función de los centros nerviosos*. Editorial Paz Montalvo, 1967.
- Perry CG, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. High-intensity aerobic interval training increases fat and carbohydrate metabolic capacities in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*; 33(6): 1112-1123, 2008.
- Pertsov SS, Meshcheryakov AF, Glushkov RG, Sudakov KV. Spike activity of neurons in the lateral hypothalamus in rats during microiontophoretic application of melatonin and noradrenaline. *Neurosci Behav Physiol*; 34(5): 479-484, 2004.
- Piot C, Veerkamp JH, Bauchart D, Hocquette JF. Contribution of mitochondria and peroxisomes to palmitate oxidation in rat and bovine tissues. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*; 121(2): 185-194, 1998.
- Popowski LA, Oppliger RA, Patrick LG, Johnson RF, Kim JA, Gisolf CV. Blood and urinary measures of hydration status during progressive acute dehydration. *Med Sci Sports Exerc*; 33(5): 747-753, 2001.

- Poortmans JR, Vanderstraeten J. Kidney function during exercise in healthy and diseased humans. An update. *Sports Med*; 18(6): 419-437, 1994.
- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 44(4): 175-200, 2009.
- Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*; 49(8): 654-664, 1993.
- Renaud LP. CNS pathways mediating cardiovascular regulation of vasopressin. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 23(2): 157-160, 1996.
- Rivier C, Vale W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressine. *Nature*; 305(5932): 325-327, 1983.
- Roberts MM, Robinson AG, Fitzsimmons MD, Grant F, Lee WS, Hoffman GE. c-Fos expression in vasopressin and oxytocin neurons reveals functional heterogeneity within magnocellular neurons. *Neuroendocrinology*; 57(3): 388-400, 1993.
- Robertson GL. Abnormalities of thirst regulation. *Kidney Int*; 25(2): 460-469, 1984.
- Robinson DM, Ogilvie RW, Tullson PC, Terjung RL. Increased peak oxygen consumption of trained muscle requires increased electron flux capacity. *J Appl Physiol*; 77(4): 1941-1952, 1994.
- Rocha MJ, Franci CR, Antunes-Rodrigues J. Participation of cholinergic and adrenergic synapses of the medial septal area (MAS) in the natriuretic and kaliuretic responses to intraventricular hypertonic saline (NaCl). *Physiol Behav*; 34(1): 23-28, 1985.
- Rodríguez LP, López-Rego J, Calbet JA, Valero R, Varela E, Ponce J. Effects of training status on fibers of the musculus vastus lateralis in professional road cyclists. *Am J Phys Med Rehabil*; 81(9): 651-660, 2002.

- Roepstorff C, Schjerling P, Vistisen B, Madsen M, Steffensen CH, Rider MH, Kiens B. Regulation of oxidative enzyme activity and eukaryotic elongation factor 2 in human skeletal muscle: influence of gender and exercise. *Acta Physiol*; 184(3): 215-224, 2005.
- Ronkainen H, Vakkuri O, Kauppila A. Effect of physical exercise on the serum concentrations of melatonin in female runners. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 65(8): 827-829, 1986.
- Ross A, Leveritt M. Long-term metabolic and skeletal muscle adaptations to short-sprint training: implications for sprint training and tapering. *Sports Med*; 31(15): 1063-82, 2001.
- Saavedra JM, Brownstein M, Axelrod J. A specific and sensitive enzymatic-isotopic microassay for serotonin in tissues. *J Pharmacol Exp Ther*; 186(3): 508-515, 1973.
- Saavedra JM, Israel A, Plunkett LM, Kurihara M, Shigematsu K, Correa FM. Quantitative distribution of angiotensin II binding sites in rat brain by autoradiography. *Peptides*; 7(4): 679-687, 1986.
- Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*; 13(2): 329-380, 1992.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*; 240(4857): 1328-1331, 1988.
- Sahlin K, Jorfeldt L, Henriksson KG, Lewis SF, Haller RG. Tricarboxylic acid cycle intermediates during incremental exercise in healthy subjects and in patients with McArdle's disease. *Clin Sci (Colch)*; 88(6): 687-693, 1995.
- Saito T, Soya H. Delineation of responsive AVP- containing neurons to running stress in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 286(3): 484- 490, 2004.
- Saltin B, Nazar K, Costill DL, Stein E, Jansson E, Essén B, Gollnick D. The nature of the training response; peripheral and central adaptations of one-legged exercise. *Acta Physiol Scand*; 96(3): 289-305, 1976.

- Sapper CB, Loewy AD, Swanson LW, Cowan WM. Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res*; 117: 305-312, 1976.
- Sawka MN, Francesconi RP, Young AJ, Pandolf KB. Influence of hydration level and body fluids on exercise performance in the heat. *JAMA*; 252(9): 1165-1169, 1984.
- Scheurink AJ, Steffens AB, Bouritius H, Dreteler GH, Bruntink R, Remie R, Zaagsma J. Sympathoadrenal influence on glucose, FFA, and insulin levels in exercising rats. *Am J Physiol*; 256(1-2): 161-168, 1989.
- Schumacher YO, Schmid A, Grathwohl D, Bültermann D, Berg A. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med Sci Sports Exerc*; 34(5): 869-875, 2002.
- Schwartz MD, Nunez AA, Smale L. Differences in the suprachiasmatic nucleus and lower subpraventricular zone of diurnal and nocturnal rodents. *Neuroscience* 127(1); 13-23, 2004.
- Sejersted OM, Vøllestad NK, Medbø JI. Muscle fluid and electrolyte balance during and following exercise. *Acta Physiol Scand Suppl*; 556: 119-127, 1986.
- Serrano AL, Quiroz-Rothe E, Rivero JL. Early and long-term changes of equine skeletal muscle in response to endurance training and detraining. *Pflugers Arch*; 441(2-3): 263-274, 2000.
- Serrano E, Venegas C, Escames G, Sánchez-Muñoz C, Zabala M, Puertas A, de Haro T, Gutierrez A, Castillo M, Acuna-Castroviejo D. Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition. *J Sports Sci*; 28(10): 1047-56, 2010.
- Share L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev*; 68(4): 1248-1284, 1988.
- Shoemaker JK, Howard JG, Ball-Burnet M, Grant S. Relationships between fluid an electrolyte hormones and plasma volume during exercise with training and detraining. *Med Sci Sports Exerc*; 30: 497-505, 1998.
- Simpson DP. Citrate excretion a window on renal metabolism. *Am J Physiol*; 244: 131-136, 1983.

- Simpson JB, Routtenberg A. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. *Science*; 181: 1172-1175, 1973.
- Singewald N, Salchner P, Sharp T. Induction of c-Fos expression specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol Psychiatry*; 53: 275-183, 2003.
- Skrinar GS, Bullen BA, Reppert SM, Peachey SE, Turnbull BA, McArthur JM. Melatonin responses to exercise training in women. *J Pineal Res*; 7(2): 184-194, 1989.
- Soya H. Stress response to exercise and its hypothalamic regulation: role of arginine-vasopressin. Págs. 21-37. En: *Exercise, nutrition and environmental stress*. Nose H, Gisolfi CV, Imaizumi K. (Eds.), 2001.
- Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K, Saito T. Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res*; 58(4): 341-348, 2007.
- Srere PA. Citrate Synthase. *Methods Enzymol*; 13: 3-11, 1969.
- Starbuck EM, Fitts DA. Subfornical organ disconnection and Fos-like immunoreactivity in hypothalamic nuclei after intragastric hypertonic saline. *Brain Res*; 951(2): 202-208, 2002.
- Storrie B, Madden EA. Isolation of subcellular organelles. *Methods Enzymol*; 182:203-225, 1990.
- Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, Loewy AD. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labelling with pseudorabies virus. *Brain Res*; 491(2):274-296, 1989.
- Strassman RJ, Appenzeller O, Lewy AJ, Qualls CR, Peake GT. Increase in plasma melatonin, beta-endorphin, and cortisol after a 28.5-mile mountain race: relationship to performance and lack of effect of naltrexone. *J Clin Endocrinol Metab*; 69(3): 540-545, 1989.

- Stricker EM, Sved AF. Thirst. *Nutrition*; 16(10): 821-826, 2000.
- Stricker EM, Sved AF. Controls of vasopressin secretion and thirst: similarities in signals. *Physiol Behav*; 77(4-7): 731-736, 2002.
- Swanson LW, Cowan WM. The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol*; 160: 1-12, 1976.
- Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic sub-divisions and the organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double labelling methods. *J Comp Neurol*; 194(3): 555-570, 1980.
- Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci*; 6: 269-324, 1983.
- Takamata A, Nose H, Kinoshita T, Hirose M, Itoh T, Morimoto T. Effect of acute hypoxia on vasopressin release and intravascular fluid during dynamic exercise in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 279(1): 161-168, 2000.
- Talanian JL, Galloway SD, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *J Appl Physiol*; 102(4): 1439-47, 2007.
- Talanian JL, Holloway GP, Snook LA, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 299(2): 180-188, 2010.
- Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett*; 70(1-2): 65-71, 1993.
- Tang JE, Hartman JW, Phillips SM. Increased muscle oxidative potential following resistant training in induced fibre hypertrophy in young men. *Appl Physiol Nutr Metab*; 31(5): 495-501, 2006.

- Tannenbaum MG, Reiter RJ, Vaughan MK, González-Brito A. Adrenalectomy prevents changes in rat pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity induced by acute insulin stress. *J Pineal Res*; 4(4): 395-402, 1987.
- Tarjan E, Denton DA, Weisinger RS. Corticotropin-releasing factor enhances sodium and water intake/excretion in rabbits. *Brain Res*; 542(2): 219-224.
- Tarnopolsky MA, Rennie CD, Robertshaw HA, Fedak-Tarnopolsky SN, Devries MC, Hamadeh MJ. Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 292(3): 1271-1278, 2007.
- Tavakoli-Nezhad M, Schwartz WJ. Hamsters running on time: is the lateral habenula a part of the clock? *Chronobiol Int*; 23(1-2): 217-224, 2006.
- Tavartkiladze AG, Simoniia GV, Kolbaia DT, Petriashvili TG. Biochemical and clinical aspects of melatonin biosynthesis induced by noradrenalin in experiment. *Georgian Med News*; 133: 86-88, 2006.
- Taylor AW, Bachman L. The effects of endurance training on muscle fibre types and enzyme activities. *Can J Appl Physiol*; 24(1): 41-53, 1999.
- Terada S, Tabata I, Higuchi M. Effect of high-intensity intermittent swimming training on fatty acid oxidation enzyme activity in rat skeletal muscle. *Jpn J Physiol*; 54(1): 47-52, 2004.
- Terrados Cepeda N. Metabolismo energético durante la actividad física. Págs. 34-47. En: *Fisiología de la Actividad Física y del Deporte*. Javier González Gallego. Editorial Interamericana-McGraw-Hill; 1ª Ed., 1992.
- Tetsuo M, Poth M, Markey SP. Melatonin metabolite excretion during childhood and puberty. *J Clin Endocrinol Metab*; 55: 311-313, 1982.
- Theintz G, Lang U, Deriaz O, Ceretelli P, Sizonenko P. Steroid. *J Biochem*; 20:1470, 1984.

- Theron JJ, Oosthuizen JMC, Rautenbach MM. Effect of physical exercise on plasma melatonin levels in normal volunteers. *South Afr Med J*; 66(22): 838-841, 1984.
- Thibodeau GA. *Anatomía y Fisiología*. Editorial Elsevier, 6ªEd., 2007.
- Thrasher TN. Baroreceptor regulation of vasopressin and rennin secretion: low-pressure versus high-pressure receptor. *Front Neuroendocrinol*; 15(2): 157-196, 1994.
- Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK. Effects of subfornical organ lesions on acutely induced thirst and salt appetite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 277: 56-65, 1999.
- Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol*; 8: 223-271, 1898.
- Toftegaard NT. A method for enzymatic determination of citrate in serum and urine. *Scand J Clin Lab Invest*; 36(6): 513-519, 1976.
- Troiani ME, Reiter RJ, Tannenbaum MG, Puig-Domingo M, Guerrero JM, Menendez-Pelaez A. Neither pituitary gland nor the sympathetic nervous system is responsible for eliciting the large drop in elevated rat pineal melatonin levels due to swimming. *J Neural Transm*; 74(3): 149-160, 1988a.
- Troiani ME, Reiter RJ, Vaughan MK, Oaknin S, Vaughan GM. Swimming depresses nighttime melatonin content without changing N-acetyltransferase. *Neuroendocrinology*; 47(1): 55-60, 1988b.
- Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol*; 264: 484-509, 1996.
- Ueck M, Troiani ME, Reiter RJ. Transient reduction in pineal melatonin levels but not N-acetyltransferase activity in rats forced to swim for 15 minutes at night. *Neuroendocrinol Lett*; 10: 81-90, 1987.



- Vakkuri O, Leppäluoto J, Vuolteenaho O. Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer. *Acta Endocrinol (Copenh)*; 106(2): 152-157, 1984.
- Vander AJ. Control of renin release. *Physiol Rev*; 47(3): 359-382, 1967.
- Vaughan GM, Bell R, de la Peña A. Nocturnal plasma melatonin in humans: episodic pattern and influence of light. *Neurosci Lett*; 14(1): 81-84, 1979.
- Vaughan GM. Human melatonin in physiologic and diseased states: neural control of the rhythm. *J Neural Transm (Suppl)*; 21: 199- 215, 1986.
- Verney EB. The antidiuretic hormone and the factors which determinate its release. *Proc Soc Lond B Biol*; 135(878): 25-105, 1947.
- Villa Vicente JG, de Paz Fernández JA, González Gallego JG. Bases para la condición física y la preparación deportiva. Págs. 23-34. En: *Olimpismo y Medicina Deportiva*. Marcos Becerro JF, Santonja Gómez R. Editor Santonja R, 1996.
- Walsh R, Noakes TD, Hawley JA, Dennis SC. Impaired high intensity cycling performance time at low levels of dehydration. *Int J Sports Med*; 15(7): 392-398, 1994.
- Walter M. Interactions between calcium, magnesium, inorganic phosphate, citrate and protein in normal human plasma. *J Clin Invest*; 40: 723-730, 1961.
- Warty VS, Busch RP, Virji MA. A kit for citrate in foodstuffs adapted for assay of serum and urine. *Clin Chem*; 30(7): 1231-1233, 1984.
- Wasserman DH, Cherrington AD. Hepatic fuel metabolism during muscular work: role and regulation. *Am J Physiol*; 260(6): 811-824, 1991.
- Weigand G, Remington SJ. Citrate synthase: structure, control and mechanism. *Ann Rev Biophys Chem*; 15: 97-117, 1986.
- Weisinger RS, Denton DA, McKinley MJ, Nelson JF. ACTH induced sodium appetite in rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 8(4): 339-342, 1978.

- Welshman SG, McCambridge H. The estimation of citrate in serum and the urine using a citrate lyase technique. *Clin Chim Acta*; 46(3): 243-246, 1973.
- Wilkinson M, Arendt J, Bradtke J, de Ziegler D. Determination of dark-induced increase of pineal N-acetyl transferase activity and simultaneous radioimmunoassay of melatonin pineal, serum and simultaneous radioimmunoassay of melatonin pineal, serum and pituitary tissue of the male rat. *J Endocrinol*; 72(2): 243-244, 1977.
- Wilmore JH, Costill DL. Introducción a la fisiología del esfuerzo y del deporte. En: *Fisiología del esfuerzo y del deporte*. Editorial Paidotribo, 4ª Ed., 2001.
- Wilson JD, Foster DW. *William's Textbook of Endocrinology*. Págs. 517-664. Philadelphia: WB Saunders Company, 8ª Ed., 1998.
- Wittert GA, Stewart DE, Graves MP, Ellis MJ, Evans MJ, Wells JE, Donald RA, Espiner EA. Plasma corticotrophin releasing factor and vasopressin responses to exercise in normal man. *Clin Endocrinol*; 35(4): 311-317, 1991.
- Wright SH, Kippen I, Klinenberg JR, Wright EM. Specificity of the transport system for tricarboxylic acid cycle intermediates in renal brush borders. *J Membr Biol*; 57(1): 73-82, 1980.
- Wu HJ, Chen KT, Shee BW, Chang HC, Huang YJ, Yang RS. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and haematological parameters. *World J Gastroenterol*; 10(18): 2711-2714, 2004.
- Yaga K, Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Hattori A. Unusual responses of nocturnal pineal melatonin synthesis and secretion to swimming: attempts to define mechanisms. *J Pineal Res*; 14(2): 98-103, 1993.
- Yamaguchi N, Suzuki-Kasaba M, Hisa H, Hayashi Y, Yoshida M, Satoh S. Interaction between norepinephrine release and intrarenal angiotensin II formation during renal nerve stimulation in dogs. *Cardiovasc Pharmacol*; 35(6): 831-837, 2000.
- Yanagita S, Amemiya S, Suzuki S, Kita L. Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life Sci*; 80(4): 356- 363, 2006.

- Yang G, Gray TS, Sigmund CD, Cassell MD. The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Res*; 817(1-2): 123- 131, 1999.
- Yaspelkis BB 3rd, Castle AL, Ding Z, Ivy JL. Attenuating the decline in ATP arrests the exercise training-induced increases in muscle GLUT4 protein and citrate synthase activity. *Acta Physiol Scand*; 165(1):71-9, 1999.
- Zacchia M, Preisig P. Low urinary citrate: an overview. *J Nephrol*; 23(16): 49-56, 2010.



