

ADAPTACIÓN HORMONAL
E INMUNOLÓGICA
AL ENTRENAMIENTO

2

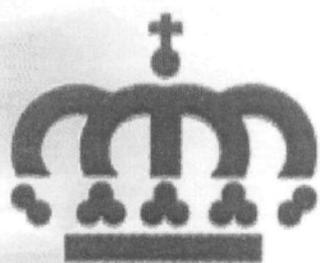


CSD

CONSEJO SUPERIOR
DE DEPORTES

ESTUDIOS SOBRE
CIENCIAS DEL DEPORTE

ADAPTACIÓN HORMONAL
E INMUNOLÓGICA
AL ENTRENAMIENTO **2**



CSD

CONSEJO SUPERIOR
DE DEPORTES

ESTUDIOS SOBRE
CIENCIAS DEL DEPORTE

COLECCIÓN «ESTUDIOS SOBRE CIENCIAS DEL DEPORTE»

En 1994 apareció el primer número de unas publicaciones monográficas con el título general de «**SERIE ICd DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DEL DEPORTE**». Esta publicación del Consejo Superior de Deportes tenía como objetivo satisfacer la demanda de información científica especializada, difundiendo los trabajos que, en la mayoría de los casos eran el resultado de proyectos de investigación subvencionados por el propio organismo y los cuales, por su calidad, actualidad y rigor científico, se consideraban de interés para los especialistas.

Al cabo de varios años, la demanda de este tipo de información sigue vigente, pero se ha visto la necesidad de atender también otras demandas y difundir informes técnicos, estadísticas y estudios que, siendo de gran interés para determinados sectores, no tenían cabida en la serie interpretando su título en un sentido estricto.

Este es el motivo que ha llevado al editor a crear un nuevo título de colección más amplio y con una imagen nueva —«**Estudios sobre Ciencias del Deporte**»—, bajo el cual continuará, por un lado, con el mismo planteamiento de calidad y rigor científico la **Serie de Investigación**. Al igual que en la etapa anterior, los trabajos que se publican en la misma son seleccionados por un Comité Científico, y están sujetos a la «Normativa General para la presentación de trabajos» del Programa de publicaciones del Consejo Superior de Deportes.

Por otra parte, se inicia, con numeración independiente y dentro de la misma colección, una nueva «**Serie de Informes**», con contenidos y objetivos diferentes que se seleccionarán con los criterios adecuados para satisfacer las necesidades de distintos sectores de destinatarios sobre temas y aspectos de actualidad.

Los nuevos nombres e imagen se aplican también a los números de la «**SERIE ICd DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DEL DEPORTE**» que, como el presente, han quedado agotados y se reeditan.

Las referencias bibliográficas correspondientes a los artículos publicados en la colección «Estudios sobre Ciencias del Deporte», elaboradas por el Servicio de Documentación, se remiten para su inclusión en la base de datos bibliográfica sobre deportes ATLANTES, fruto de la colaboración entre distintos centros de documentación e información y bibliotecas deportivas españolas e iberoamericanas. Esta base de datos se encuentra en uno de los dos CD-ROM de Silver Platter que albergan además SPORTDISCUS y HERACLES.

Director editorial:

Antonio Guerrero Olea

Coordinación editorial:

Erika Schwarz

Miguel Angel Gutiérrez

Consejo asesor:

Fernando Andrés Pérez, Alicia Canda, Javier Durán, Amelia Ferro Sánchez, Mónica de la Fuente, Manuel García Ferrando, Rafael Manso, Cristobal Moreno, Agustín Meléndez, Ramiro Merino Merchán, Cecilia Rodríguez Bueno, Silvio Rubio, Luis M. Ruíz Pérez, Fernando Sánchez Bañuelos, Benilde Vázquez.

Unidad editora:

Ministerio de Educación,
Cultura y Deporte
Consejo Superior de Deportes

© 2001

Edición no venal.

N.I.P.O.: 663-09-003-1

Depósito Legal: M-14322-2009

Distribución e información:

Centro de Alto Rendimiento y de
Investigación en Ciencias del Deporte
C/ del Greco s/n Tl. 915.89.05.50
28040 Madrid 915.89.68.77
Fax 91/544.81.22

Web: <http://www.csd.mec.es>

Email: csd.publicaciones@csd.mec.es

Venta:

Centro de Publicaciones del MECyD
Ciudad Universitaria
28040 Madrid Tl. 914.53.98.00
Fax: 914.53.98.83

Librería del B.O.E.

C/ Trafalgar, 29 Tl. 915.38.21.11
28071 Madrid Fax 91/538.21.21

NOTA: Los trabajos presentados expresan el criterio y valoraciones de sus autores sin que el Consejo Superior de Deportes comparta necesariamente las tesis y conceptos expuestos en ellos. Permitida la reproducción parcial citando la fuente.

ÍNDICE

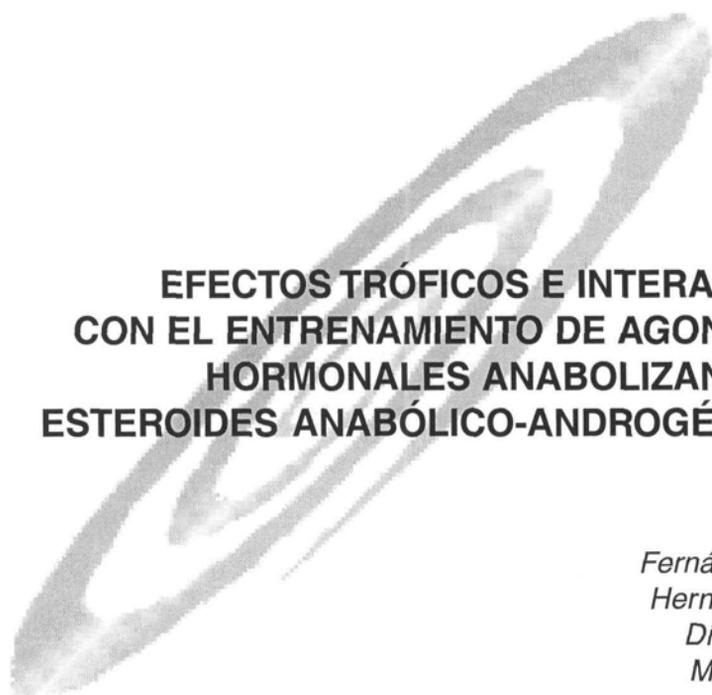
ADAPTACIÓN HORMONAL E INMUNOLÓGICA AL ENTRENAMIENTO

	<u>Pág.</u>
Efectos tróficos e interacción con el entrenamiento de agonistas hormonales anabolizantes I: Esteroides anabólico-androgénicos	7
<i>Fernández, E, Hernando, R., Díaz, A. E., Mansó, R.</i>	
Efectos tróficos e interacción con el entrenamiento de agonistas hormonales anabolizantes II: Agonistas β-adrenérgicos, clenbuterol	33
<i>Fernández, E., Hernando, R., Ferrández, M^a D., Manso, R.</i>	
Estado inmunológico de deportistas de alta competición	53
<i>Ferrández Ortiz, M^a D., Fuente del Rey, M. de la</i>	

Icd - N^o 2

Estudios sobre Ciencias del Deporte. Serie de Investigación

MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CULTURA Y DEPORTE
Consejo Superior de Deportes



**EFFECTOS TRÓFICOS E INTERACCIÓN
CON EL ENTRENAMIENTO DE AGONISTAS
HORMONALES ANABOLIZANTES I:
ESTEROIDES ANABÓLICO-ANDROGÉNICOS**

*Fernández, E.¹
Hernando, R.¹
Díaz, A. E.²
Mansó, R.¹*

Dirección para correspondencia:

Rafael Manso
Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"
Universidad Autónoma de Madrid
Cantoblanco, 28049 Madrid
Tel.: 91 397 48 71
Fax: 91 397 47 99

¹ Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid.

² Centro de Medicina Deportiva, CNICD, Consejo Superior de Deportes, 28040 Madrid.



Rafael Manso Martínez, es Dr. en Ciencias Naturales por la Universidad de Tübingen (Alemania) y Dr. en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid, de la que es actualmente Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular. Ha sido director del Instituto de Ciencias de la Educación Física y del Deporte del Consejo Superior de Deportes y miembro del Comité de Expertos en Investigación en Materia Deportiva del Comité para el Desarrollo del Deporte del Consejo de Europa, entre 1988 y 1990. Dirige en la actualidad un grupo de investigación dedicado al estudio de la importancia del sistema endocrino y de la respuesta celular de estrés en la adaptación al entrenamiento, en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), en la U. Autónoma de Madrid.

Angel Enrique Díaz Martínez, es Licenciado en Ciencias Biológicas y Especialista en Análisis Clínicos. Actualmente es Jefe de Servicio del Laboratorio de análisis Clínicos del Centro Nacional de Medicina Deportiva en el Centro Nacional de Investigación y Ciencias del Deporte (Consejo Superior de Deportes).

Raquel Hernando Sebastián, es Licenciada en Ciencias Biológicas y realiza su tesis doctoral sobre la inducción de proteínas de estrés por el ejercicio y su modulación por el entrenamiento y la modificación endocrina en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM).

Esther Fernández Rodríguez, es Licenciada en Ciencias Biológicas y realiza su tesis doctoral sobre el efecto de los esteroides anabólico-androgénicos sobre las respuestas adaptativas al entrenamiento en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM).

Resumen: El propósito de este estudio fué analizar comparativamente los efectos tróficos de una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabólico-androgénicos (EAAs), el decanoato de nandrolona (ND) y el estanozolol (ST), así como de la interacción de los tratamientos con la aplicación de dos programas de entrenamiento de larga duración, usando ratas Wistar macho como modelo experimental. El entrenamiento aeróbico, aunque no el de larga duración, redujo significativamente la ganancia de peso corporal, un efecto que también realiza la nandrolona de forma más intensa. Con la única excepción del efecto de la ND en el músculo EDL de animales que siguieron el programa de entrenamiento de alta intensidad, los tratamientos con EAAs no incrementaron el peso del músculo esquelético en relación a los correspondientes controles sin tratar, aunque hicieron más consistentes los efectos tróficos del entrenamiento. El ND, como también se observó con el entrenamiento de forma más limitada, presentó efectos miocardiográfico y renotrófico, que no se observaron con el estanozolol. El tratamiento con ambos anabolizantes redujo mucho el peso de las cápsulas adrenales y modificó el peso de los órganos linfáticos, reduciendo el del timo e incrementando el del bazo. Ambos entrenamientos también redujeron el peso del timo de forma muy significativa. La aplicación de los programas de entrenamiento, particularmente el de tipo aeróbico, compensó parcialmente algunos de los efectos de los EAAs sobre las adrenales y los órganos linfáticos. Los parámetros séricos analizados indican algunos cambios inducidos por el entrenamiento y los tratamientos con anabolizantes. Del conjunto de los datos puede concluirse que los dos esteroides anabolizantes actúan a través de mecanismos diferentes, aunque ambos coinciden en hacer más consistentes los efectos tróficos del entrenamiento sobre el músculo esquelético.

Palabras clave: Decanoato de nandrolona, estanozolol, entrenamiento en tapiz rodante, músculo esquelético, miocardio, efecto renotrófico, ratas Wistar macho.

INTRODUCCION

Los andrógenos naturales, tales como la testosterona, presentan la capacidad de inducir un doble efecto, anabolizante y androgénico, sobre los órganos sexuales accesorios y sobre el sistema nervioso, el lóbulo anterior de la hipófisis, el riñón, el hígado y el músculo, por mencionar los principales órganos diana (revisado en ref. 29). La actividad promotora de la síntesis proteica y del engrosamiento muscular de los andrógenos (que se denomina efecto miotrófico o anabolizante), es difícil de poner de manifiesto en animales adultos del sexo masculino eugonadales, es decir, con función testicular normal, aunque puede observarse fácilmente en animales con función gonadal reducida (hipogonadales) o castrados (9, 11, 29, 43). En algunas especies animales se han caracterizado músculos particularmente sensibles a los andrógenos, de los que un ejemplo característico es el complejo muscular perineal de la rata (formado por los músculos *levator ani*, *bulbocavernosus* e *ischiocavernosus*). Precisamente por esta sensibilidad de respuesta, constituye un sistema neuromuscular sexualmente dimórfico, característica que comparte con el músculo de la laringe de *Xenopus laevis* o el músculo siríngeo de los pájaros, también utilizados como modelos para el estudio de los mecanismos de acción de los andrógenos sobre el músculo. Con estos músculos como sistema experimental se ha puesto de manifiesto que la testosterona actúa durante el desarrollo muscular induciendo un aumento del número de fibras (hiperplasia) y un engrosamiento de las ya existentes (hipertrofia), lo que indica que la miogénesis inducida por los andrógenos juega un papel importante en la masculinización de estos músculos (39). Por el contrario, en los animales adultos, el efecto de la testosterona sobre las fibras musculares esqueléticas y cardíacas parece limitarse a la hipertrofia de fibras individuales sin que se incremente su número; la castración induce atrofia y la administración de testosterona hipertrofia (revisado por Mooradian, 29).

Debido a su sensibilidad a los andrógenos, el engrosamiento del músculo *levator ani* ha sido utilizado durante mucho tiempo para evaluar la actividad miotrófica mediante un test biológico sensible a pesar de que, debido a que este músculo no constituye un verdadero órgano extragenital (14), las respuestas no son representativas de los efectos de los andrógenos sobre el músculo esquelético. Como se ha indicado anteriormente, el músculo esquelético suele dar respuestas pequeñas cuya magnitud depende de la especie animal y del grupo muscular considerado. En el hombre, por ejemplo, los músculos de la zona pectoral y de los hombros, parecen ser más sensibles a los efectos de los andrógenos que los de otras zonas corporales, lo que parece coincidir con los músculos más sensibles a andrógenos en otras especies animales (29, 44).

Desde los trabajos pioneros de Kochakian (18) dirigidos a caracterizar los grupos funcionales responsables de los efectos anabolizante y androgénico, tratando de disociar ambas funciones, se han sintetizado un gran número de compuestos con estructuras y actividad relacionada con la de los andrógenos naturales y se han realizado numerosos estudios estructura-función sin que hasta el momento haya sido posible disociar la actividad anabolizante de la androgénica o virilizante. A los derivados sintéticos de los esteroides sexuales naturales que comparten con éstos el carácter anabolizante, se les conoce bajo la denominación común de esteroides anabolizantes, y más correctamente, esteroides anabólico-androgéni-

cos (EAAs, detalles sobre la naturaleza y actividad biológica de estos compuestos pueden encontrarse en las referencias 7, 23, 24, 34, 43). Además de sus aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de varios tipos de deficiencias de andrógenos, anemias y situaciones que cursan con balance negativo de nitrógeno, los esteroides anabólico-androgénicos vienen siendo utilizados desde hace más de treinta años en una gran variedad de deportes en la creencia de que permiten incrementar el rendimiento deportivo. Durante muchos años su uso se limitó a las especialidades en las que la actividad atlética depende de la fuerza o potencia musculares ya que inicialmente solo se les supuso la capacidad biológica de actuar sobre el tamaño muscular. Posteriormente, han sido introducidos en otras especialidades deportivas que dependen principalmente de la capacidad aeróbica, asumiendo que también permiten incrementarla (13, 19, 21, 23, 37, 43). A pesar de que se han realizado numerosos estudios para tratar de caracterizar los efectos de los esteroides anabolizantes sobre la composición y función musculares, tanto en humanos como en modelos experimentales animales, todavía no existen datos concluyentes que permitan asignar a los esteroides anabólico-androgénicos la capacidad de modificar el músculo esquelético en individuos eugonadales de forma tal que se incremente su actividad funcional en beneficio del rendimiento deportivo.

Algunos trabajos realizados en modelos experimentales animales, sugieren que algunos esteroides anabólico-androgénicos ejercen un efecto positivo sobre la síntesis proteica (27), la concentración de proteínas miofibrilares (31) y la actividad de enzimas mitocondriales y sarcotubulares en varios músculos de la rata (12, 35), la capacidad de realizar trabajo(10) o la recuperación postfatiga de la contracción del músculo sóleo (38), mientras que otros trabajos describen la ausencia de efectos de los andrógenos sobre la composición o función muscular, incluso considerando la conjunción con el ejercicio físico, durante la hipertrofia muscular compensatoria o en modelos de inactividad muscular (2, 4, 20, 25, 40,). Los estudios realizados en humanos para caracterizar los efectos de los esteroides anabólico-androgénicos tampoco ofrecen resultados concluyentes. El número de estudios que muestran ligeros efectos de estos compuestos sobre la potencia o la masa muscular viene a ser aproximadamente igual al de trabajos que concluyen que la administración de esteroides anabolizantes resulta inefectiva (7).

La dificultad de dar respuestas claras a gran número de cuestiones relativas a los efectos biológicos de los esteroides anabolizantes, aunque sea en sistemas biológicos modelo, ha originado un cierto distanciamiento entre el mundo científico y el de la competición deportiva. De ahí que la caracterización de los efectos de estos compuestos y su interacción con la actividad física en diferentes deportes, así como las consecuencias que de ellos pueden extraerse desde el doble punto de vista del rendimiento deportivo y de la salud de los deportistas, constituya un problema de indudable interés científico y social. Las dificultades para dar respuestas científicas precisas a cuestiones relacionadas con la actividad biológica de esteroides anabolizantes, se asocian a una serie de factores, entre los que cabe mencionar los siguientes: 1) la diversidad de esteroides anabolizantes existentes y su utilización en diferentes combinaciones de más de un compuesto, con diversidad de protocolos de administración y dosificaciones de 10 a 1000 veces superiores a las recomendadas en la terapia de reposición, 2) la imposibilidad de realizar en humanos estudios rigurosamente controlados en los que se utilicen

dosis de anabolizantes equivalentes a las que son objeto de uso ilegítimo en algunos medios deportivos (muy superiores a las dosis farmacológicas), 3) la utilización en la experimentación de una gran diversidad de modelos animales en conjunción con diferentes anabolizantes esteroídicos, utizando dosis y vías de administración diversas y 4) la generalización frecuente de que todos los esteroides anabólico-androgénicos tienen un mecanismo de acción común, que se desencadena cuando estos compuestos o sus metabolitos interaccionan con el receptor intracelular de andrógenos.

Los esteroides anabólico-androgénicos constituyen realmente un grupo muy heterogéneo de compuestos que suelen clasificarse en tres series diferentes dependiendo de su afinidad estructural con los anillos del androstano, androsteno o estreno (34), y que se diversifican considerablemente por la presencia de sustituyentes, modificaciones en los anillos, esterificación de grupo hidroxilo en C-17 o alquilación de este mismo átomo de carbono (34, 43). Por otro lado, además de interaccionar con el receptor intracelular de andrógenos, los esteroides anabolizantes también son capaces de interaccionar con otros receptores de hormonas esteroídicas (2, 26, 32, 33) e incluso con sitios diferentes de los receptores intracelulares clásicos (8). Como la afinidad de la interacción ligando/receptor puede variar en algunos órdenes de magnitud según el esteroide anabólico-androgénico que se considere (o sus metabolitos activos) y el receptor esteroídico implicado, las diferencias en las respuestas pueden ser muy pronunciadas. Por otro lado, se ha sugerido que el efecto potenciador de los anabolizantes solo ocurre cuando estos compuestos se administran al tiempo que se está inmerso en un programa de entrenamiento intenso y se ingiere una dieta adecuada (42), lo que sugiere que la interacción con los diversos tipos de entrenamiento pudiera ser un elemento modulador importante en la manifestación de las respuestas biológicas de los esteroides anabólico-androgénicos.

El presente trabajo se refiere a la caracterización de los efectos tróficos de una dosis suprafarmacológica de dos anabolizantes esteroídicos que han sido ampliamente utilizados en medios deportivos con la intención de incrementar el rendimiento en la competición, usando ratas Wistar macho como modelo experimental. Además de analizar los efectos de los tratamientos sobre la ganancia de peso corporal y la masa de varios músculos de las patas traseras, el miocardio, el hígado y el riñón, también se aborda en este trabajo la interacción de los tratamientos con la aplicación de diversos programas de entrenamiento. En su ejecución se ha tenido en cuenta que las respuestas a los esteroides anabolizantes pueden depender tanto del anabolizante como de su interacción con cada tipo de entrenamiento, por lo que el estudio se ha realizado con dos anabolizantes esteroídicos, utilizando dos programas de entrenamiento en tapiz rodante, ambos de 3 meses de duración pero de intensidad y demanda metabólica diferente, uno de ellos de alta intensidad y el otro, menos intenso, dirigido al incremento de la capacidad aeróbica. Los anabolizantes utilizados, el decanoato de nandrolona (ND, 19-nortestosterona, un derivado del anillo del estreno) y el estanozolol (ST, un derivado del anillo del androstano), se escogieron teniendo en cuenta su potencia como anabolizantes (índice miotrófico-androgénico), su utilización en medios deportivos y sus diferencias estructurales, a pesar de su actividad anabolizante común. La nandrolona es uno de los anabolizantes esteroídicos conocidos desde hace más tiempo, y probablemente que más se ha utilizado, 5 veces más activo

en aumentar el peso del músculo levator ani que el de la vesícula seminal cuando se administra a ratas castradas (41), y cuya afinidad por el receptor de andrógenos es considerablemente superior a la de la testosterona (5). El estanozolol, un derivado de la dihidrotestosterona, la forma activa de la testosterona en muchos tejidos, presenta un índice miotrófico-androgénico extraordinariamente alto, siendo 100 veces más activo que la testosterona si se comparan las relaciones de inducción de crecimiento m. levator ani/próstata (4). Ambos anabolizantes se administraron como derivados de liberación lenta, por vía intramuscular, a una dosis de 10 mg/Kg/semana que, siendo muy superior a la farmacológica, está en el rango de las concentraciones de uso ilícito en medios deportivos. Además de los datos relativos al desarrollo corporal y efectos tróficos, también se han analizado una serie de parámetros séricos como indicadores metabólicos y de la situación general de las ratas.

Según los datos obtenidos los tratamientos con estos esteroides anabólico-androgénicos no incrementan el peso de los músculos esqueléticos analizados en animales sedentarios y, con la única excepción del tratamiento con ND en animales que siguieron el programa de entrenamiento de alta intensidad, tampoco parecen afectar a los animales entrenados cuando se comparan con los controles sin tratar. No obstante, administrados durante el entrenamiento, permitieron observar efectos más consistentes, particularmente en los músculos formados preferentemente por fibras rápidas. La nandrolona incrementó el peso del miocardio de manera muy significativa, como también lo hizo la aplicación del programa de entrenamiento de alta intensidad, y manifestó un efecto renotrófico acusado, efectos ambos que no se observaron con el estanozolol. En los animales sedentarios, el tratamiento con ambos anabolizantes redujo ligeramente el porcentaje de agua en el músculo esquelético, efecto que deja de observarse en los músculos de los animales entrenados. Del conjunto de los datos obtenidos puede concluirse que los dos esteroides anabolizantes actúan a través de mecanismos diferentes, aunque ambos coinciden en hacer más consistentes los efectos del entrenamiento sobre el músculo esquelético.

MATERIALES Y METODOS

Sistema experimental. Se usaron ratas Wistar macho como modelo experimental. En los seis grupos de ratas del experimento correspondiente a la aplicación del programa de entrenamiento de alta intensidad (experimento 1, E1), las ratas tenían 6-7 semanas y pesaban 228 ± 18 g cuando se comenzaron las sesiones de entrenamiento; en los otros seis grupos del experimento en que se aplicó el programa de entrenamiento de intensidad moderada, dirigido al incremento de la capacidad oxidativa muscular (experimento 2, E2), las ratas tenían 5-6 semanas y pesaban 172 ± 11 g. Los animales se criaron en el estabulario del Centro de Biología Molecular en la Universidad Autónoma de Madrid en donde se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22-24 °C) y humedad (50-60%) con una fotoperiodicidad 12 h (de 8 de la mañana a 8 de la tarde). Las ratas se mantuvieron en grupos homogéneos de 5-7 animales por caja (59 x 39 x 20 cm), con aporte de alimentación (dieta estándar para rata) y agua *ad libitum*. La manipulación para el pesado (3 veces por semana) y tratamiento con esteroides anabólico-androgénicos (una vez por semana) se realizó entre las 8 y las 11 de la

mañana. Los entrenamientos se realizaron siempre a la misma hora, entre la 1 y las 4 de la tarde en los grupos correspondientes al primer programa de entrenamiento, el de alta intensidad, y entre la 8 y las 11 de la mañana, para los grupos correspondientes al programa de entrenamiento dirigido al aumento de la capacidad aeróbica. En ambos experimentos, los tres grupos de animales entrenados (sin tratamiento, tratados con decanoato de nandrolona y tratados con estanozolol) se complementaron con otros tres grupos equivalentes de animales sedentarios para analizar los efectos del ejercicio y las posibles interacciones de los anabolizantes con cada uno de los programas de entrenamiento.

Tratamientos y programas de entrenamiento. En los dos experimentos, antes de iniciarse las sesiones de entrenamiento, las ratas se preentrenaron en el tapiz rodante para adiestrarlas en el funcionamiento del mismo y para seleccionar aquellas que parecían adaptarse más fácilmente. Se separaron así dos grupos, el formado por los animales que no se ejercitarían (sedentarios, $n=15$ en el primer experimento y $n=18$ en el segundo), y el formado por los animales que se someterían al correspondiente programa de entrenamiento ($n=18$ en el primer experimento y $n=21$ en el segundo). Después de 4 semanas de entrenamiento, cada uno de estos grupos se subdividió en tres subgrupos de 5-7 animals (grupo control, sin tratamiento, y grupos tratados con decanoato de nandrolona o con estanozolol). Tanto el decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin, Organon Española, Barcelona) como el estanozolol (Winstrol Depot, Zambon SA, Barcelona) se inyectaron por vía intramuscular, una vez a la semana, a una dosis de 10 mg/kg/semana. Los grupos control, sin tratamiento, recibieron una inyección intramuscular semanal de la misma cantidad de la solución soporte sin el esteroide. Los tratamientos se continuaron durante 9 semanas, hasta la finalización del programa de entrenamiento, con la última inyección 4 días antes del sacrificio de los animales.

Las ratas se ejercitaron en tapices rodantes (Li 8706, Letica Scientific Instruments, Barcelona) equipados con una rejilla electrificada para forzar el mantenimiento del ejercicio según lo planificado. El programa de entrenamiento de alta intensidad (13 semanas de duración, 5 días/semana de lunes a viernes) basado en un aumento gradual de la velocidad desde 20 hasta 24 m/min y de la duración (desde 30 hasta 60 min) de la carrera, y en el aumento de la pendiente por saltos de 4% desde 0 al 24% (tabla 1, parte superior), se diseñó para estudiar procesos adaptativos y respuestas fisiológicas a un entrenamiento de larga duración y alta carga, tanto en ausencia como en presencia de anabolizantes. Durante la última semana de entrenamiento, cuando la pendiente se incrementó hasta el 24 %, algunos animales manifestaron grandes dificultades para completar las sesiones de entrenamiento. En este punto la carrera se interrumpió de forma individualizada cuando los animales se fatigaban. En el programa de entrenamiento menos intenso, dirigido a aumentar la capacidad respiratoria, (también de 13 semanas de duración, 5 días/semana, de lunes a viernes, véase tabla 1 parte inferior), se aumentó gradualmente la velocidad (de 20 a 30 m/min) y la duración de las sesiones de entrenamiento (de 30 a 85 min) a lo largo del programa, con un ligero aumento de la pendiente (4 y 8%) en la parte final del mismo.

Extracción y análisis de los tejidos. Al finalizar el programa de entrenamiento, al menos 24 h después de la última sesión, las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de 50 mg/Kg de Pentothal (thiopental sódico, Abbott, primer experimento) o con 200 μ l/100 g de peso corporal de una solución de 40 mg/ml de

	Semana (nº)	Duración (min.)	Vel. (m/min)	Pte (%)
Expto nº1	1	30	20	0
	2	35	20	8
	3	40	20	8
	4	40	21	8
	5	45	21	12
	6	45	22	12
	7	45	22	16
	8	50	22	16
	9	50	23	16
	10	50	23	20
	11	55	23	20
	12	60	24	20
	13	60	24	24
Expto nº2	1	30	20	0
		30	20	0
		35	20	0
		35	20	0
		40	20	0
	2	40	22	0
	3	45	23	0
	4	55	23	0
	5	55	25	0
	6	60	26	0
	7	60	26	4
	8	70	26	4
	9	70	28	4
10	75	29	4	
11	75	29	8	
12	80	30	8	
13	85	30	8	

TABLA 1. Detalle de los dos programas de entrenamiento en tapiz rodante utilizados en los experimentos

ketamina (Ketolar, Parke-Davis) y 5 mg/ml xilazina (Rompun, Bayer), en el segundo experimento. Tras la disección rápida *in vivo* de varios músculos de las patas traseras (Extensor de los dedos largos, EDL; Tibial, TA y Sóleo, SO), y extracción de unos 2 ml de sangre para el análisis de diversos parámetros séricos, se procedió a la perfusión hepática con 15 ml de solución salina fisiológica fría y extracción del hígado y los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo entonces el corazón y los riñones, el timo, el bazo y las adrenales. Antes de congelar en nitrógeno líquido, los órganos se lavaron pasándolos por solución salina fisiológica fría, se secaron por contacto con papel de cromatografía 3MM (Whatman) y se pesaron. Los tejidos congelados se conservaron a -80 °C hasta la realización de los análisis bioquímicos. En los tres tipos de músculo esquelético extraídos se analizó el contenido en agua mediante pesada de fragmentos de tejido, congelado y tras su liofilización durante la noche. El contenido de agua se expresó como porcentaje del peso húmedo (P. húmedo-P. seco/P. húmedo). Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10.000 rpm durante tres

minutos. El suero resultante se congeló y se conservó a -70°C hasta su utilización para la cuantificación de metabolitos y actividades enzimáticas, que se realizaron por química seca utilizando un equipo Kodack Ectachem.

Análisis estadístico. Los datos se expresaron como valores promedio \pm desviación estándar del número de animales que se indica en cada caso en las leyendas de las figuras o de las tablas. El análisis estadístico se realizó mediante regresión múltiple con variables dicotómicas. Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando el test de la *t* de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$, y muy significativas cuando $p < 0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Efecto de la aplicación de dos programa de entrenamiento en tapiz rodante y tratamiento por separado con dos esteroides anabólico-androgénicos sobre la ganancia de peso corporal. En la Figura 1 se representan las ganancias relativas de peso (peso del animal inmediatamente antes del sacrificio menos su peso inicial, dividido por el peso inicial) en los diferentes grupos de animales de los dos experimentos. Como puede observarse, los resultados de los dos experimentos son esencialmente idénticos si se excluye el hecho de que el entrenamiento menos intenso, dirigido a un incremento de la capacidad aeróbica, tuvo como consecuencia una reducción muy significativa de la ganancia relativa de peso. Aunque se aprecia la misma tendencia en los animales entrenados siguiendo el programa de alta intensidad (fig. 1, parte superior), no se alcanza significación estadística. La principal causa de esta diferencia probablemente deba buscarse en la diferente demanda metabólica de los dos programas de entrenamiento, pero también podría jugar un cierto papel una mayor diversidad de respuesta al entrenamiento intenso, que hace que las diferencias entre los componentes del grupo aumenten.

El efecto más evidente, común a ambos experimentos, y que se reproduce tanto en los animales sedentarios como en los entrenados, es la disminución de la ganancia de peso corporal que induce el decanoato de nandrolona a la dosis utilizada de 10 mg/kg/semana, durante dos meses ($p < 0,01$). El estanozolol, por el contrario, no presentó ningún efecto, ni impidió el descenso de la ganancia relativa de peso en los animales entrenados siguiendo el programa de entrenamiento aeróbico. El efecto de la nandrolona se puso de manifiesto de forma muy rápida tras el comienzo de los tratamientos, aunque las diferencias no alcanzaron valores estadísticamente significativos hasta las últimas semanas de aplicación del programa de entrenamiento. En las ratas entrenadas mediante el programa de entrenamiento aeróbico, la administración de decanoato de nandrolona tiene un efecto aditivo al del entrenamiento, resultando una reducción en la ganancia de peso corporal de más del 30 %.

En algunos de los estudios realizados en humanos se ha descrito un aumento del peso corporal como consecuencia de la administración de esteroides anabolizantes, aunque en otros casos no se ha observado ganancia de peso corporal (revisado en ref. 43). Este incremento no se asigna solamente a un aumento de la masa magra sino que también se atribuye, al menos en parte, a cambios hemáticos. El hematocrito puede incrementarse en aproximadamente 1 g/dl (36, 1) y aumentar el volumen sanguíneo total en aproximadamente un 15 % (17, revisión en ref. 43). Este aumento podría venir mediado por un estímulo de la síntesis de eritropoyetina por los andró-

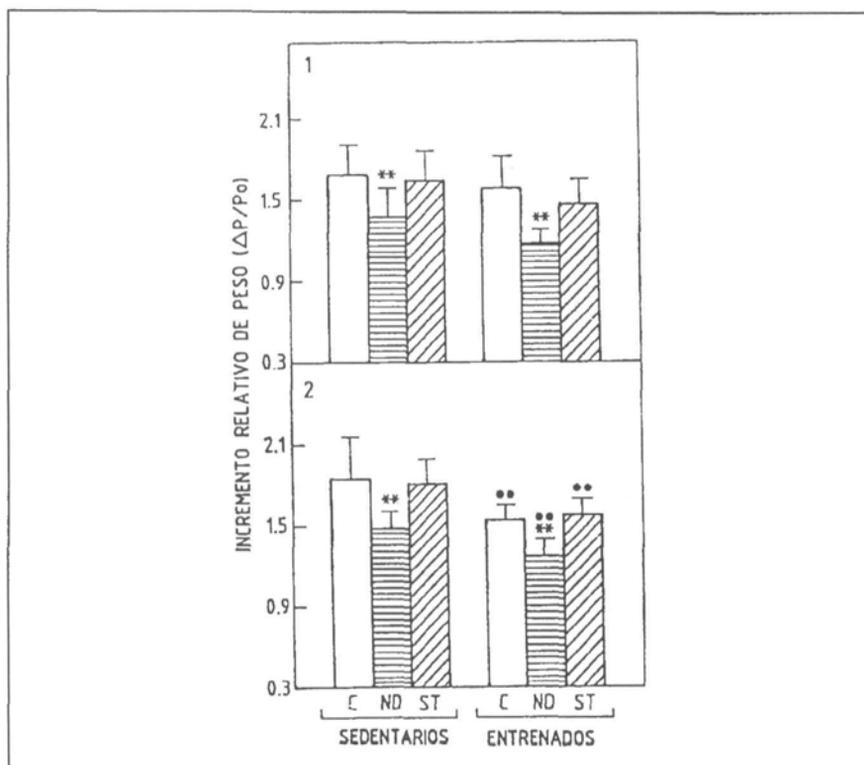


Figura 1. Efecto del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabólico-androgénicos y de la aplicación de dos programas de entrenamiento de larga duración, sobre la ganancia de peso corporal. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar del incremento de peso corporal en los tres meses de duración de los experimentos referido al peso corporal inicial, en los diversos grupos (4-6 animales/grupo) de dos experimentos en los que se aplicaron programas diferentes de entrenamiento en tapiz rodante, uno de ellos de alta intensidad (1), y el otro, menos intenso, dirigido al incremento de la capacidad aeróbica (2). C, control sin tratamiento; ND, decanoato de nandrolona; ST, estanozolol. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

genos (28), lo que explicaría un efecto de estos esteroides sobre el consumo máximo de oxígeno y, por lo tanto, también sobre la capacidad atlética en deportes de alto componente aeróbico. Al menos para alguno de los compuestos utilizados se esperaba una respuesta similar a la descrita en humanos para otros anabolizantes (15), lo que no ha sido corroborado por los datos obtenidos en este trabajo. Más bien al contrario, los efectos del decanoato de nandrolona no responden a su actuación como anabolizante sino más bien a lo que se podría esperar de un glucocorticoide. Aunque no puede excluirse a priori que existan diferencias de respuesta a los andrógenos dependientes del sistema biológico, el incremento de peso en respuesta a tratamiento con esteroides anabólico-androgénicos en humanos no parece tener carácter general, sino que depende del anabolizante utilizado, su dosis y forma de administración, régimen alimenticio y tipo de entrenamiento, como principales factores. En relación con lo comentado en la introducción sobre el posible efecto antiglucocorti-

coide de algunos anabolizantes merece la pena recordar que el glucocorticoide natural más abundante en la rata es la corticosterona, mientras que en el hombre es el cortisol. Desde esta perspectiva sería posible interpretar que algunos efectos biológicos de esteroides anabólico-androgénicos que se desencadenaran por unión al receptor de glucocorticoides, pudieran ser diferentes en el hombre y en la rata.

Efecto de la aplicación de dos programas de entrenamiento en tapiz rodante y del tratamiento por separado con una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabolizantes, sobre el peso de tres tipos diferentes de músculo esquelético de las patas traseras de la rata. En la figura 2 se representan los datos obtenidos en el músculo extensor de los dedos largos (EDL), formado casi en su totalidad por fibras rápidas. Como puede observarse, en ninguno de los experimentos se

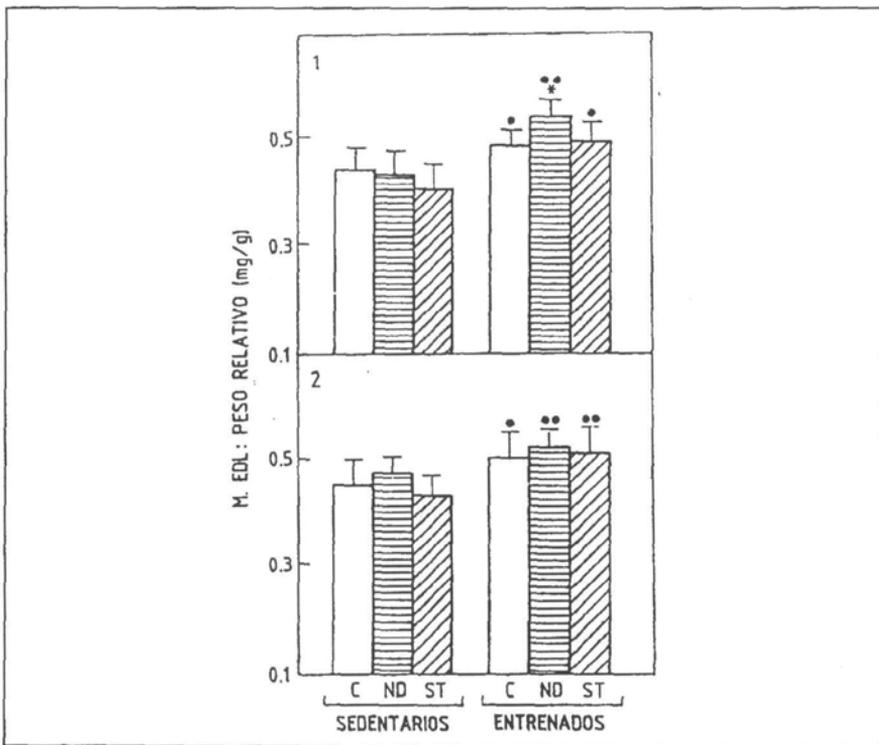


Figura 2. Efecto del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabólico-androgénicos y de la aplicación de dos programas de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración, sobre el peso del músculo extensor de los dedos largos (EDL). Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos de los músculos (en mg) referidos al peso corporal (en g), de los grupos (4-6 animales/grupo) de dos experimentos en los que se aplicaron programas de entrenamiento en tapiz rodante diferentes, uno de ellos de elevada intensidad (1) y el otro, menos intenso, dirigido al aumento de la capacidad aeróbica (2). Como los músculos de ambas patas traseras se consideraron independientemente, el número de muestras por grupo es el doble del número de animales. C, control sin tratamiento; ND, decanoato de nandrolona; ST, estanozolol. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

aprecian incrementos en el peso de este músculo por los tratamientos. Los dos entrenamientos incrementaron significativamente el peso muscular ($p < 0,05$), en el caso del entrenamiento de alta intensidad con diferencias que están en el límite de la significación estadística, resultando los efectos del entrenamiento más consistentes cuando se administró alguno de los anabolizantes ($p < 0,01$). Además, en los animales entrenados siguiendo el programa de entrenamiento de alta intensidad, aunque no en el aeróbico, el tratamiento con decanoato de nandrolona indujo un aumento significativo del peso del músculo EDL en relación con los controles sin tratar. Es preciso indicar que es el único caso a lo largo de este trabajo en el que se ha observado que un esteroide anabolizante sea capaz de incrementar significativamente el peso de un músculo por encima de lo que lo hace el propio entrenamiento.

En la figura 3 se muestran los datos correspondientes al músculo tibial, que en la rata también está formado casi exclusivamente por fibras de contracción rápida, si bien existe una mayor proporción de las de tipo oxidativo-glucolítico. Como puede

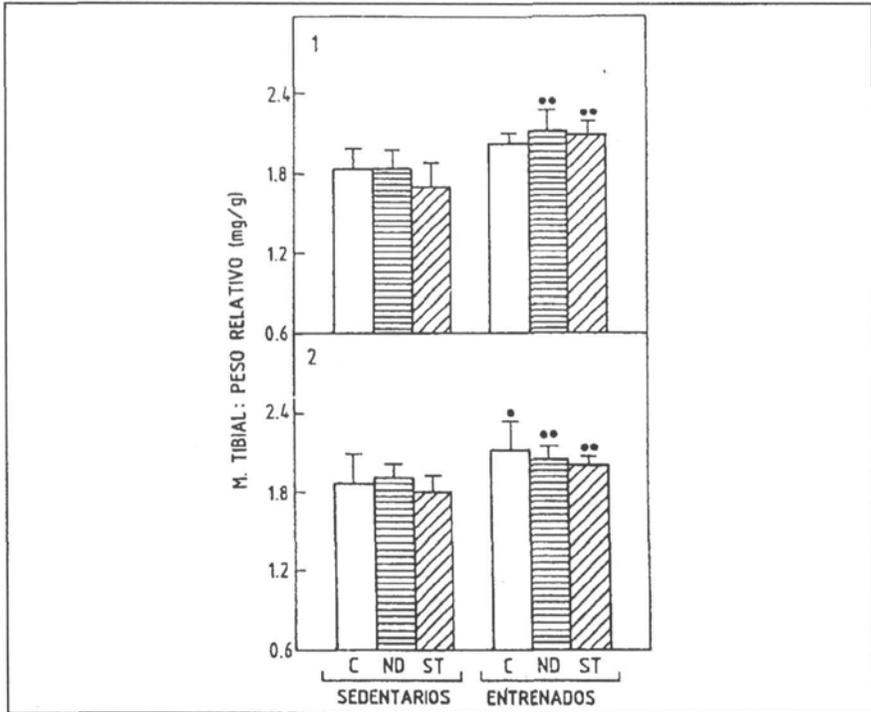


Figura 3. Efecto del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabólico-androgénicos y de la aplicación por separado de dos programas de entrenamiento de larga duración, sobre el peso del músculo tibial. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos de los músculos (en mg) referidos al peso corporal (en g), de los grupos (4-6 ratas/grupo) de dos experimentos en los que se aplicaron programas de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración diferentes, uno de ellos de elevada intensidad (1) y el otro, menos intenso, dirigido al aumento de la capacidad aeróbica (2). Como los músculos de ambas patas traseras se consideraron independientemente, el número de muestras por grupo es el doble del número de animales. C, control sin tratamiento; ND, decanoato de nandrolona; ST, estanozolol. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

observarse, los datos se corresponden casi exactamente con los obtenidos para el músculo EDL, si exceptuamos el hecho de que el entrenamiento de alta intensidad no llegó a incrementar significativamente la masa del músculo tibial, aunque se observa claramente la tendencia. La presencia de ambos anabolizantes hizo consistentes los aumentos de peso muscular debidos al entrenamiento haciéndolos muy significativos ($p < 0,01$).

El tercer tipo de músculo de las patas traseras que se analizó fué el sóleo que, contrariamente a los dos músculos anteriores, está formado casi exclusivamente por fibras de contracción lenta. Este músculo interviene en el soporte esquelético y responde al peso del animal (en el hombre se atrofia en ausencia de fuerza gravitatoria). Los cambios en el peso de este músculo en respuesta a los tratamientos y entrenamientos utilizados se representan en la figura 4. Como puede obser-

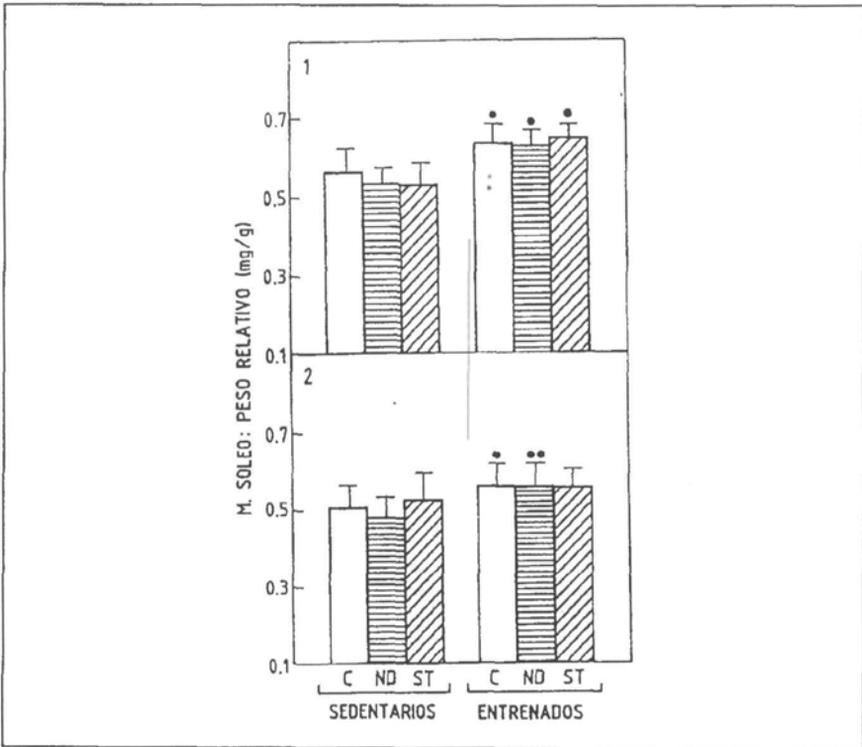


Figura 4. Efecto del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabólico-androgénicos y de la aplicación de dos programas de entrenamiento de larga duración, sobre el peso del músculo sóleo. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos de los músculos (en mg) referidos al peso corporal (en g), de los grupos (4-6 ratas/grupo) de dos experimentos en los que se aplicaron programas de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración diferentes, uno de ellos de alta intensidad (1) y el otro, menos intenso, dirigido al aumento de la capacidad aeróbica (2). Como los músculos de ambas patas traseras se consideraron independientemente, el número de muestras por grupo es el doble del número de animales. C, control sin tratamiento; ND, decanoato de nandrolona; ST, estanozolol. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

vase en esta figura, tampoco se aprecia un efecto de estos anabolizantes sobre las fibras de contracción lenta, mientras que los dos entrenamientos aumentaron significativamente ($p < 0,05$) la masa muscular. La presencia de los esteroides anabolizantes durante el entrenamiento tampoco incrementó el tamaño muscular por encima del efecto del propio entrenamiento, aunque se observó una mayor consistencia de las diferencias debidas al entrenamiento cuando se administra decanoato de nandrolona durante la aplicación del programa de entrenamiento aeróbico ($p < 0,01$). Sin embargo, el análisis detallado de estos datos pone de manifiesto que la mayor consistencia del efecto del entrenamiento en presencia de nandrolona no es debido a un incremento adicional del peso relativo de los músculos en los animales entrenados sino a una ligera reducción de su peso medio en los animales sedentarios, debida al tratamiento, que no alcanzó significación estadística.

El análisis del contenido en agua de los tres músculos en los diferentes grupos de animales del experimento en que se aplicó el programa de entrenamiento de alta intensidad ha puesto de manifiesto que los tratamientos con los anabolizantes, en la dosis y duración utilizadas, reducen el contenido de agua en los músculos de manera aparentemente independiente del tipo de músculo (tabla 2). De un 76.7 % aproximadamente, en los animales del grupo control se pasó al 75 % para los tratados con nandrolona y al 74,1 % para los tratados con estanozolol, como valores promedio de los tres tipos de músculo. El entrenamiento, sin embargo, no tuvo ningún efecto apreciable sobre el contenido en agua de estos músculos, y el tratamiento adicional con los dos anabolizantes no dió lugar a modificaciones apreciables del contenido en agua (tabla 2). Aunque no se dispone de datos para confirmarlo, una posible interpretación de estos datos estaría en la alteración del equilibrio hídrico y del sodio y el potasio en el músculo de los animales sedentarios tratados con anabolizantes, lo que revertiría por el entrenamiento.

	G. SEDENTARIOS			G. ENTRENADOS		
	CONTROL	ND	ST	CONTROL	ND	ST
Soleo	76,3±0,6	74,4±0,8*	73,9±0,5**	77,8±1,0	76,4±0,8	75,8±0,6
Tibial	76,9±0,7	74,9±0,9*	74,0±0,8**	76,3±0,6	75,3 ±0,7	75,6±1,0
EDL	76,8±0,9	75,6±1,2	74,7±0,9*	75,9±0,8	75,8 ±1,3	76,2±0,7

*Los valores representan los porcentajes de agua obtenidos mediante pesada de fragmentos de tejido congelados y tras liofilización durante la noche, expresados como relación entre la diferencia de peso húmedo y el residuo seco de la liofilización y el peso húmedo. Se representan las medias ± desviación estándar de datos de 4 animales por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ grupos tratados frente a no tratados.*

TABLA 2. Contenido en agua de tres músculos de las patas traseras en ratas sedentarias o sometidas a un programa de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración, en ausencia de tratamiento (control) o tras administrar separadamente una dosis semanal de 10 mg/kg de decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST), durante los dos últimos meses.

Efecto de la aplicación de dos programas de entrenamiento y del tratamiento por separado con dos esteroides anabolizantes sobre el incremento de peso del miocardio. La aplicación del programa de alta intensidad incrementó significativamente el peso relativo del miocardio (aproximadamente un 23 %, $p < 0,05$) tanto en ausencia de tratamiento con anabolizantes como en presencia de estanozolol (fig. 5, parte superior). El decanoato de nandrolona, en ausencia de entrenamiento, indujo una hipertrofia cardíaca de magnitud próxima a la inducida por el entrenamiento de alta intensidad (15-25 %, $p < 0,05$), aunque se observa una gran dispersión de valores, indicativa de la diversidad en la sensibilidad de respuestas individuales a la nandrolona. En las ratas entrenadas en presencia de ND no se observaron incrementos estadísticamente significativos en el peso del miocardio por efecto del entrenamiento, independientemente del programa aplicado. Ello sugiere que el mecanismo por el que el decanoato de nandrolona induce la hipertrofia cardíaca pudiera coincidir con el que actúa durante la aplicación del programa de entrenamiento de alta intensidad para producir el mismo efecto.

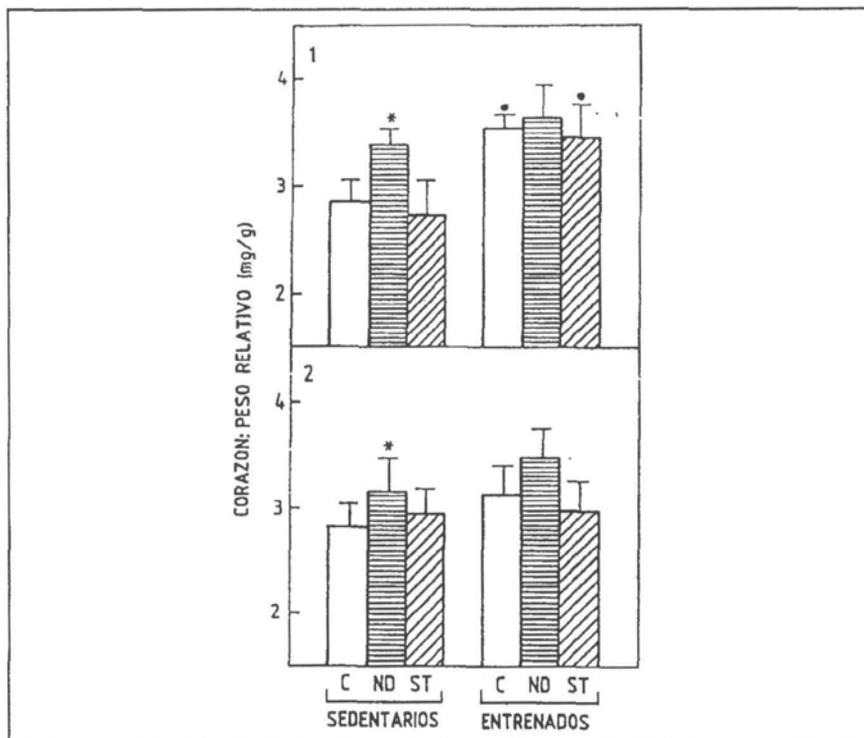


Figura 5. Efecto del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabólico-androgénicos y de aplicación de dos programas de entrenamiento de larga duración, sobre el peso del miocardio. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos del músculo cardíaco (en mg) referidos al peso corporal (en g), de los grupos (4-6 ratas/grupo) de los dos experimentos en los que se aplicaron programas de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración diferentes, uno de ellos de alta intensidad (1) y el otro, menos intenso, dirigido al aumento de la capacidad aeróbica (2). C, control sin tratamiento; ND, decanoato de nandrolona; ST, estanozolol. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

La aplicación del programa de entrenamiento aeróbico, también incrementó el valor promedio del peso relativo del miocardio (aproximadamente el 10%), aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. Como consecuencia de este efecto, aunque el valor promedio del peso del miocardio en los animales tratados con nandrolona y entrenados siguiendo el programa aeróbico es sensiblemente mayor que el que se observa en los correspondientes controles sin tratar (aproximadamente el 11%), las diferencias tampoco llegaron a ser estadísticamente significativas (véase fig.5, parte inferior). Ya que, a pesar de la dispersión existente en los grupos, las respuestas observadas en algunos de los animales se aproximan a las inducidas por la aplicación del programa de entrenamiento de alta intensidad, estos datos indican que la hipertrofia cardíaca, como parte de la adaptación cardiovascular, es una respuesta gradual que responde a la intensidad del entrenamiento. El estanozolol no afecta al proceso de adaptación normal al entrenamiento, pero el decanoato de nandrolona induce una respuesta que se asemeja a la respuesta adaptativa al ejercicio crónico.

Uno de los posibles mecanismos que permitirían interpretar el efecto del decanoato de nandrolona sobre el miocardio, podría basarse en la actuación de la nandrolona como agonista de glucocorticoides, esteroides naturales cuyos niveles se incrementan por el ejercicio como parte de la respuesta fisiológica de estrés, ya que éstos han sido descritos como inductores de hipertrofia cardíaca. La relativa afinidad de algunos esteroides anabolico-androgénicos por el receptor de glucocorticoides (22, 26), ha alentado la hipótesis de que los efectos miotróficos de algunos de los esteroides anabolizantes pudieran deberse a una actuación antagónica a la de los glucocorticoides, lo que llevaría a una reducción de la degradación de las proteínas más que a un aumento de su síntesis (6, 30). Aunque existen evidencias experimentales de que se cumplen las predicciones que se derivan de la hipótesis de que algunos esteroides anabolizantes actúan como antagonistas de glucocorticoides, las interpretaciones de los datos no son inequívocas, sugiriéndose que la actividad antiglucocorticoide pudiera explicar algunos efectos de los anabolizantes esteroides cuando se usan en dosis suprafarmacológicas pero nunca permitiría justificar el dimorfismo sexual del desarrollo muscular (43). Por otro lado, esta hipótesis, no es aceptada con carácter general y ha sido objeto de opiniones en contra (16). En el caso que nos ocupa, el miocardio de la rata, la unión de la nandrolona (o alguno de sus metabolitos) a los receptores de glucocorticoides debería ser capaz de inducir una respuesta análoga a la de los glucocorticoides. También en este caso, hay que considerar que los efectos de la nandrolona que pudieran responder a una actuación como análogo de glucocorticoides en la rata, no debe necesariamente suponer una generalización para los humanos como consecuencia de las diferencias en el glucocorticoide primario (cortisol en humanos y corticosterona en la rata).

Efecto de la aplicación de dos programas de entrenamiento y administración por separado de dos anabolizantes esteroides sobre el peso de otros órganos importantes para el desarrollo de la actividad fisiológica durante el ejercicio. En la figura 6 se representan los pesos del hígado en los diferentes grupos de los dos experimentos. Como puede observarse en esta figura, ni los entrenamientos aplicados ni los tratamientos con los esteroides anabolizantes modificaron significativamente el peso relativo del hígado, observándose solamente una dispersión elevada de los datos que indica que el peso de este órgano varía consi-

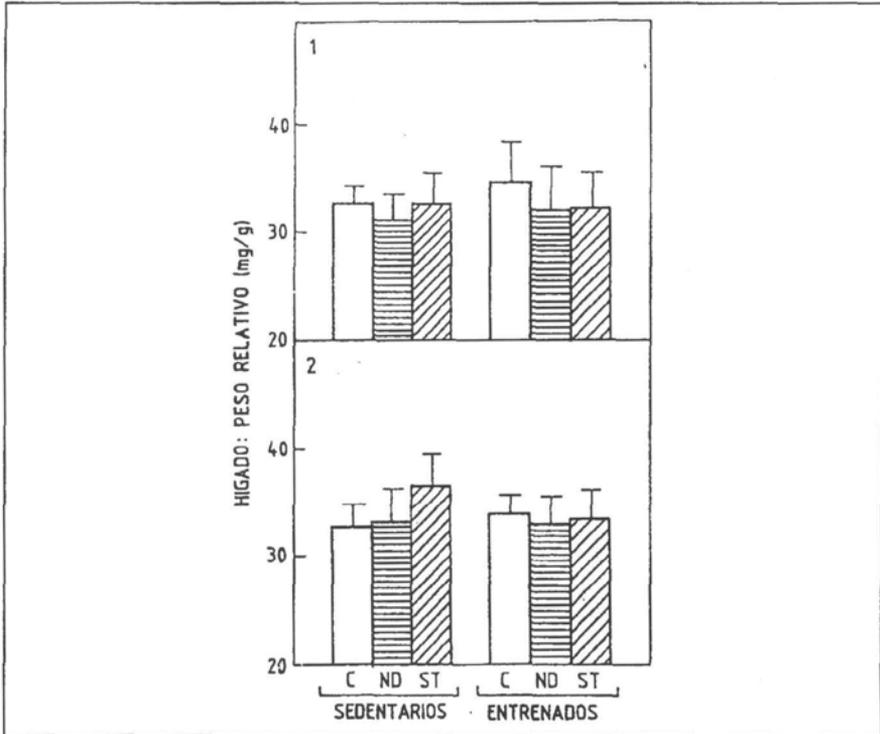


Figura 6. Efecto del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabólico-androgénicos y de la aplicación de dos programas de entrenamiento de larga duración, sobre el peso del hígado. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos del hígado (en mg) referidos al peso corporal (en g), de los grupos (4-6 ratas/grupo) de los dos experimentos en los que se aplicaron programas de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración diferentes, uno de ellos de gran intensidad (1) y el otro, menos intenso, dirigido al aumento de la capacidad aeróbica (2). C, control sin tratamiento; ND, decanoato de nandrolona; ST, estanozolol. Contrastando con lo que ocurre en los demás órganos estudiados, en el hígado no se han observado cambios tróficos estadísticamente significativos, ni por el entrenamiento ni por el tratamiento con EAA.

derablemente de individuo a individuo. A pesar de esta aparente normalidad, debido a la incidencia relativamente alta de daños hepáticos observados en individuos tratados con anabolizantes esteroides, sobre todo cuando son administrados por vía oral, se tiene previsto realizar un estudio detallado de los efectos que los tratamientos con decanoato de nandrolona y estanozolol utilizados por vía i.m. pudieran tener sobre una serie de funciones hepáticas, particularmente sobre las enzimas de defensa antioxidante dependientes de glutatión y las relacionadas con la detoxificación de xenobióticos.

Los riñones, por el contrario, sufren aumentos considerables de peso (referido al peso corporal), en respuesta al tratamiento con decanoato de nandrolona ($p < 0,01$) pero no al estanozolol. El incremento del tamaño del riñón (efecto renotrófico), también ha sido utilizado como indicador del carácter anabolizan-

te de los esteroides anabólico-androgénicos, junto al método basado en el incremento del peso del músculo *levator ani* (34). Resulta interesante que de los dos anabolizantes utilizados, ambos con un carácter anabolizante mucho más marcado que el androgénico, solamente el decanoato de nandrolona tenga actividad renotrófica, lo que indica que el mecanismo de actuación de los esteroides anabólico androgénicos no es único, aunque todos ellos pudieran coincidir en el desencadenamiento de efectos comunes en el músculo esquelético. Aunque el entrenamiento de alta intensidad no modificó sensiblemente el tamaño del riñón, la aplicación del programa de entrenamiento aeróbico tuvo como consecuencia un aumento significativo de su peso relativo, lo que sugiere, como ya se indicaba para el miocardio, que el tratamiento prolongado con decanoato de nandrolona y algunos tipos de entrenamiento pudieran actuar por mecanismos similares o que, al menos en parte, se superponen (figura 7).

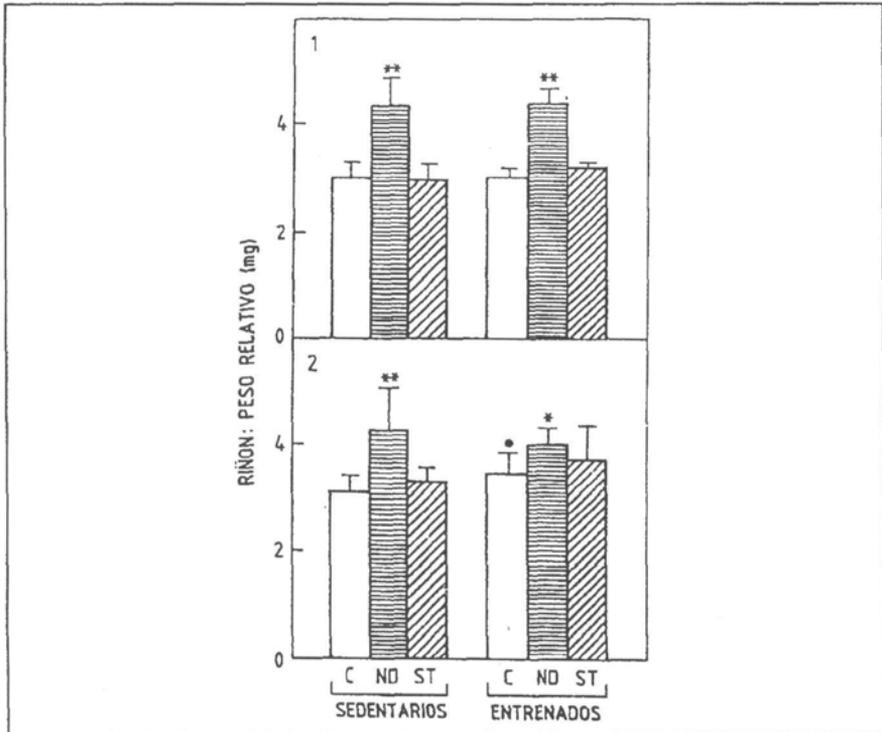


Figura 7. Efecto del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabólico-androgénicos y de la aplicación de dos programas de entrenamiento de larga duración, sobre el peso de los riñones. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar del peso de los riñones (en mg) referido al peso corporal (en g), de los grupos (4-6 ratas/grupo) de dos experimentos en los que se aplicaron programas de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración diferentes, uno de ellos de alta intensidad (1) y el otro, menos intenso, dirigido al aumento de la capacidad aeróbica (2). C, control sin tratamiento; ND, decanoato de nandrolona; ST, estanozolol. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, animales entrenados frente a los correspondientes controles sin tratar; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

Efecto de la aplicación de dos programas de entrenamiento en tapiz rodante y del tratamiento por separado con los esteroides anabólico-androgénicos decanoato de nandrolona y estanozolol, sobre el tamaño de las cápsulas adrenales y los órganos linfáticos timo y bazo. Las glándulas adrenales son productoras de las catecolaminas (médula) y de un gran número de compuestos de naturaleza esteroídica de los que los glucocorticoides (sintetizados en las zonas fasciculada y reticular) y los mineralcorticoides (sintetizados en la zona glomerular) son los más abundantes. Las células de las zonas fasciculada y reticular también producen una cierta cantidad de andrógenos, denominados andrógenos adrenales, de los que el principal representante es la deshidroepiandrosterona. Los andrógenos adrenales se liberan a la sangre, en donde actúan como precursores circulantes de la testosterona para algunos tejidos. En condiciones normales sus efectos son muy moderados pero pueden llegar a ser importantes en condiciones fisiológicas especiales o en situaciones patológicas. Debido a la sensibilidad de las células productoras de esteroides corticales a las condiciones que tienden a modificar su producción, que es consecuencia de la hipertrofia o atrofia de la zona adrenal correspondiente de manera específica según que se estimule o se inhiba la producción de la correspondiente hormona, cabe esperar alteraciones en la masa adrenal en respuesta a tratamientos con esteroides anabolizantes, así como en respuesta a situaciones de estrés. En la tabla 3 se representan las modificaciones del peso de las glándulas adrenales por los tratamientos con decanoato de nandrolona y estanozolol, así como por aplicación de los diferentes programas de entrenamiento. Como puede observarse, tanto el decanoato de nandrolona como el estanozolol redujeron muy significativamente el peso de las adrenales. Los dos entrenamientos apli-

	SEDENTARIOS			ENTRENADOS (E1)			ENTRENADOS (E2)		
	CONTROL	ND	ST	CONTROL	ND	ST	CONTROL	ND	ST
C.A.	86±22	47±13**	46±19**	71±16	58±9	61±4	66±32	70±12*	95±42*
Timo	669±64	72±14**	102±31**	243±24**	81±19**	103±31**	265±34**	113±32**	186±46
Bazo	942±35	1.058±48*	1.114±98*	929±49	1.028±35*	1.101±23*	987±55	783±62***	1.108±42

*Los valores de los pesos se expresan en mg y se dan las medias ± desviación estándar de 10-11 animales en los grupos sedentarios y de 4-6 animales en los grupos ejercitados. * p<0.05, ** p<0.01, animales tratados frente a los correspondientes sin tratar; * p<0.05, ** p<0.01 animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.*

TABLA 3. Modificaciones en el peso de los órganos linfáticos y de las cápsulas adrenales (C.A.) observados en ratas Wistar macho tras la administración por separado de una dosis de 10 mg/kg/semana de decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST) durante dos meses, en animales sedentarios o tras aplicar uno de los dos programas de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración utilizados, uno de ellos de elevada intensidad (E1) y el otro dirigido al incremento de la capacidad aeróbica (E2).

cados mostraron una tendencia a reducir el tamaño de las adrenales, aunque las diferencias no tienen significación estadística. Resulta interesante el hecho de que la aplicación de los programas de entrenamiento tiende a revertir el efecto de los tratamientos sobre la masa adrenal. En el caso de aplicación del programa de alta intensidad (E1) solo se observa una tendencia sin significación estadística, que se confirma como diferencia clara en el entrenamiento aeróbico (tabla 3), a pesar de la elevada dispersión de los datos indicativa de la variabilidad de respuestas individuales. Nuevamente, una posible explicación para la interpretación de estos datos proviene de la consideración de la capacidad de los esteroides anabolizantes de actuar como agonista parcial de glucocorticoides en las células sensibles. De este modo, actuando sobre las células productoras de factor de liberación de corticotropina en el hipotálamo y de la hormona adrenocorticotrófica en el lóbulo anterior de la hipófisis, se inhibiría la producción de glucocorticoides en las zonas fasciculada y reticular, lo que induciría su atrofia. Desafortunadamente, no se dispone de análisis histológicos que permitan concluir que se ha producido una atrofia específica de las zonas productoras de glucocorticoides, por lo que esta interpretación deberá ser confirmada en futuros estudios.

El análisis de los pesos de los órganos linfáticos timo y bazo, que también se incluyen en la misma tabla 3, resulta también de interés. Como puede observarse, el timo, un órgano linfático primario, es extraordinariamente sensible al tratamiento con ambos esteroides anabolizantes, pudiendo reducirse su peso en un 85-90 %. El entrenamiento también afectó en el mismo sentido, aunque la reducción fué de menor magnitud (65-70 %). Tras aplicación del programa de entrenamiento aeróbico, en los animales tratados se observó una tendencia a la recuperación del peso del timo, que se aproxima al valor de los controles sin tratar. El análisis de las modificaciones de peso del bazo, un órgano linfático secundario, ofrece una situación en algunos aspectos opuesta a la observada en el timo. El tratamiento con ambos anabolizantes resultó en un incremento del tamaño del bazo en los animales sedentarios. Ninguno de los dos programas de entrenamiento aplicados tuvo efecto apreciable en los animales sin tratar, aunque se observó la tendencia a reducir las diferencias entre animales tratados y no tratados (tabla 3, entrenamiento de alta intensidad, E1) e incluso a reducir el tamaño del bazo en los animales tratados con nandrolona (tabla 3, entrenamiento aeróbico, E2). Estos datos son indicativos de cambios considerables en la circulación y localización de las células del sistema inmune en respuesta a los tratamientos con anabolizantes y al entrenamiento, que sugieren modificaciones funcionales dignas de un análisis pormenorizado.

Niveles séricos de metabolitos y de enzimas marcadoras en ratas sedentarias o entrenadas aeróbicamente en tapiz rodante en ausencia de tratamiento o tras administración durante dos meses de una dosis suprafarmacológica de decanoato de nandrolona o estanozolol. Debido a que los animales fueron sacrificados dos días después de la última sesión de entrenamiento, los posibles cambios en los niveles séricos no son indicativos de respuestas agudas al ejercicio sino de cambios duraderos inducidos por el entrenamiento y/o tratamientos. Como puede observarse en la tabla 4, aunque no se observan cambios de gran magnitud, en algunos de los parámetros analizados hay modificaciones debidas al entrenamiento y/o al tratamiento con alguno de

	G. SEDENTARIOS			G. ENTRENADOS		
	CONTROL	ND	ST	CONTROL	ND	ST
Glucosa (1)	429±45	396±57	460±66	392±57	297±33**	378±30
Urea (1)	41±4	42±6	41±4	45±7	46±6	40±4
A. Urico (1)	1,9±0,4	1,8±0,2	2,3±0,6	1,3±0,1*	1,4±0,1*	1,3±0,1*
Creatinina (1)	0,4±0,0	0,5±0,1	0,4±0,05	0,4±0,05	0,4±0,04	0,4±0,02
Colesterol (1)	67±11	56±14	49±6**	55±9*	50±8	45±2*
TGC (1)	167±10	147±48	143±41	113±38*	101±19*	155±14
Prot.(1)	5,8±0,5	5,5±0,2	5,4±0,2	5,4±0,5	5,1±0,6	5,2±0,3
CK (2)	488±226	414±52	344±14	318±69	560±130*	638±114**
GOT (2)	113±38	92±3	111±18	102±16	150±29**	194±65**
LDH (2)	2610±805	1903±356	2316±527	2476±1450	5058±162**	4102±933**

1) Las concentraciones se dan en mg/dl, exceptuando la de proteínas totales que está en g/dl. 2) Las actividades enzimáticas se dan en U/l. Se representan las medias ± desviación estándar de datos de 4-6 animales por grupo. TGC, triglicéridos; CK, creatina quinasa; GOT, glutamato-oxalacetato transaminasa (aspartato aminotransferasa, AST); LDH, lactato dehidrogenasa. *p<0,05, **p<0,01, tratados frente a sin tratar; *p<0,05, **p<0,01, entrenados frente a sedentarios.

TABLA 4. Niveles séricos de algunos metabolitos y de enzimas marcadoras en ratas sedentarias o sometidas a un programa de entrenamiento en tapiz rodante de 3 meses de duración, dirigido al incremento de la capacidad aeróbica, en ausencia de tratamiento (control) o tras administrar una dosis semanal de 10 mg/kg de decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST), durante los dos últimos meses.

los anabolizantes. Los niveles séricos de glucosa, por ejemplo, aparecen reducidos de manera significativa en los animales entrenados y tratados con nandrolona, efecto que parece ser consecuencia de una interacción del entrenamiento con el tratamiento con ND ya que ninguno de los dos tiene efecto de manera independiente.

El entrenamiento redujo los niveles de ácido úrico y algo similar ocurrió con los de colesterol y triglicéridos. Sin embargo, mientras que la bajada del ácido úrico y los triglicéridos no se afectó significativamente por los tratamientos con esteroides anabolizantes, el estanozolol indujo una bajada muy significativa de los niveles de colesterol en los animales sedentarios, que se conserva con más baja significación estadística en los animales entrenados. Resulta de interés la comparación de los niveles séricos de CK, GOT y LDH, ya que las tres enzimas respondieron de forma similar a los tratamientos con anabolizantes en los animales entrenados, aunque no se observaron cambios en los animales sedentarios como consecuencia de la administración de estos compuestos. Como el denominador común de

estas tres enzimas es proceder principalmente del músculo, resulta difícil interpretar el significado de un aumento de su actividad en el suero de los animales tratados con anabolizantes, pero no de los controles sin tratar, solamente si han seguido el programa de entrenamiento, a pesar de que no se haya realizado ejercicio en las 48 horas que precedieron a la toma de muestra.

CONCLUSIONES FINALES

El análisis comparativo de los efectos del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de 10 mg/kg/semana durante dos meses de dos esteroides anabólico-androgénicos, el decanoato de nandrolona y el estanozolol, en ratas Wistar macho sedentarias o ejercitadas en tapiz rodante siguiendo dos programas de entrenamiento diferentes, ha puesto de manifiesto que ambos compuestos difieren considerablemente en las respuestas biológicas que inducen, lo que sugiere que sus mecanismos de acción deben ser diferentes. Ambos tienen en común hacer más consistentes los efectos tróficos del entrenamiento sobre el músculo esquelético (lo que se manifiesta en una mayor significación estadística de las diferencias entre los grupos). Sin embargo, mientras que el decanoato de nandrolona redujo considerablemente la ganancia de peso corporal, y aumentó el peso relativo del corazón y del riñón en los animales sedentarios, el estanozolol no presentó ninguno de estos efectos. Ambos anabolizantes coinciden, sin embargo, en reducir muy significativamente el peso de las cápsulas adrenales y del timo y en aumentar el del bazo. El entrenamiento aeróbico, aunque no el entrenamiento intenso, revierte en gran medida el efecto del tratamiento con estanozolol sobre los órganos linfáticos. Los niveles de metabolitos y de enzimas marcadoras tisulares en el suero ponen de manifiesto algunos cambios significativos debidos a procesos de adaptación al entrenamiento aeróbico y/o al tratamiento crónico con los esteroides anabolizantes. De todo ello se concluye que, aunque los efectos sobre el músculo esquelético no son muy acusados, los esteroides anabólico-androgénicos pueden inducir otros efectos tróficos indicativos de cambios funcionales profundos en los órganos afectados, que pudieran ser de trascendencia para la actividad física y el funcionamiento general del organismo. Los efectos de los dos anabolizantes esteroídicos analizados no se explican mediante un mecanismo de acción único, sugiriéndose en algunos de sus efectos, particularmente para el decanoato de nandrolona, una actividad como agonista parcial de glucocorticoides. El desarrollo de análisis bioquímicos para caracterizar el fundamento del carácter diferencial de los efectos tróficos de estos esteroides anabólico-androgénicos promete ser de gran interés para entender sus posibles efectos sobre el desarrollo de diversas capacidades atléticas, por un lado, y sobre la integridad y salud de quienes han optado por su uso, a pesar de que sea ilícito, por el otro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a M. Pérez Martínez y N. Jiménez por su colaboración en la aplicación de los programas de entrenamiento, a Javier Palacín y John Sparrowe por su ayuda en el cuidado y tratamiento de los animales y a M.D. Ferrández por su ayuda durante la extracción y pesada de los órganos. El decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin) y el estanozolol (Winstrol Depot) fueron cedidos generosamente por Organon Española, S.A., Barcelona, y

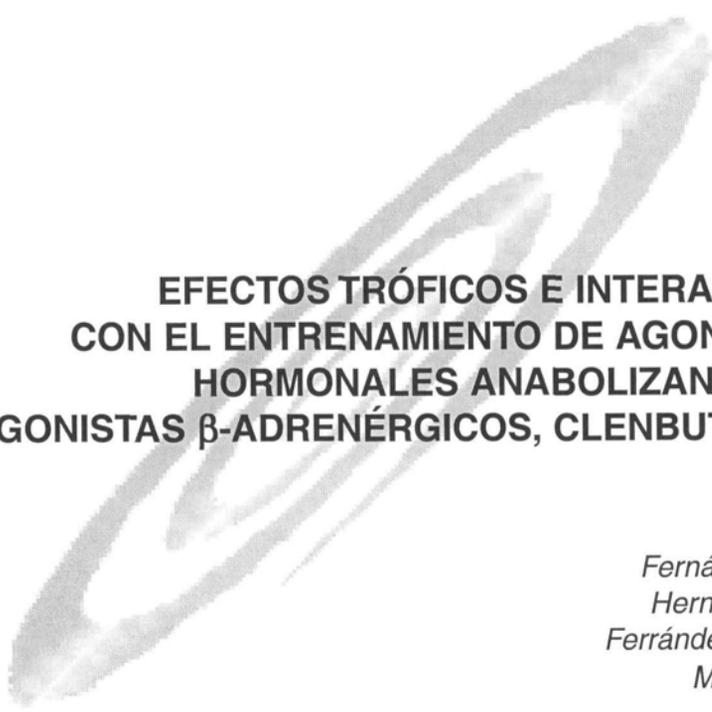
Zambon, S.A., Barcelona, respectivamente. La realización de este trabajo ha sido posible gracias a ayudas del Consejo Superior de Deportes y de la CICYT (Dep 91-0206). El Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" recibe una ayuda institucional de la fundación Ramón Areces.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alen, M. Androgenic steroid effects on liver and red cells. *Br. J. Sports Med.* 19:15-22, 1985.
2. Bartsch, W., M. Krieg, and K.D. Voigt. Regulation and compartmentalization of androgens in rat prostate and muscle. *J. Steroid Biochem.* 19:929-937, 1983.
3. Barbieri, R.L., H. Lee, and K.J. Ryan. Danazol binding to rat androgen, glucocorticoid, progesterone, and estrogen receptors: Correlation with biological activity. *Fertil. Steril.* 31:182-186, 1979.
4. Bates, P.C., L.F. Chew, and D.J. Millward. Effects of the anabolic steroid stanozolol on growth and protein metabolism in the rat. *J. Endocrinol.* 114:373-381, 1987.
5. Bergink, E.W., P.S.L.Janssen, E.W. Turpijn, and J. Van der Vies. Comparison of the receptor binding properties of nandrolone and testosterone under in vitro and in vivo conditions. *J. Steroid Biochem.* 22:831-836, 1985.
6. Buttery, P.J., and B.G. Vernon. Protein metabolism in animals treated with anabolic agents. *Vet. Res. Commun.* 7:11-17, 1983.
7. Celotti, F., and P. Negri Cesi. Anabolic steroids: A review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43:469-477, 1992.
8. Domínguez Boada, L. Caracterización farmacológica de un lugar de alta especificidad para el esteroide anabolizante estanozolol en microsomas hepáticos. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 1994
9. Evans, W. J., and J. L. Ivy. Effects of testosterone propionate on hindlimb-immobilized rats. *J. Appl. Physiol.* 52:1643-1647, 1982.
10. Exner, G.U., H.W. Staudte, and D. Pette. Isometric training of rats. Effects upon fast and slow muscle and modification by an anabolic hormone (nandrolone deca-noate). II. Male rats. *Pfluegers Arch.* 345:15-22, 1973.
11. Griggs, R.C., W. Kingston, R.F.Jezefowicz, B.E. Herr, G. Forbes, and D. Halliday. Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis. *J. Appl. Physiol.* 66:498-503, 1989.
12. Guzmán, M., A. Saborido, J. Castro, F. Molano, and A. Magías. Treatment with anabolic steroids increases the activity of the mitochondrial outer carnitin palmitoyltransferase in rat liver and fast-twitch muscle. *Biochem. Pharmacol.* 41:833-835, 1991.

13. Haupt, H.A., and G.D. Rovere. Anabolic steroids: A review of the literature. *Am. J. Sports Med.* 12:469-483, 1984.
14. Hayes, K. J. The so-called 'levator ani' of the rat. *Acta Endocr.* 48:337-347, 1965.
15. Hervey, G.R., A.V. Knibbs, L. Burkinshaw, D.B. Morgan, P.R.M. Jones, D.R. Chettle, and D. Vartsky. Effects of methandienone on the performance and body composition of men undergoing athletic training. *Clin. Sci.* 60:457-463, 1981.
16. Hickson, R.C., S.M. Czerwinski, M.T. Falduto, and A.P. Young. Glucocorticoid antagonism by exercise and androgenic-anabolic steroids. *Med. Sci. Sports Exerc.* 22:331-340, 1990.
17. Holma, P. Effect of an anabolic steroid (metandienone) on central and peripheral blood flow in well-trained male athletes. *Ann. Clin. Res* 9:215-..., 1977. (Los esteroides anabolizantes incrementan el volumen sanguíneo en un 15% o más)
18. Koochakian, C.D., Humm, J.H., and Bartlett, M.N. Effect of steroids on the body weight, temporal muscle and organs of the guinea pig. *AM. J. Physiol.* 155:242-, 1948.
19. Kopera, H. The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. *Acta Endocrinol.* 110 (Suppl. 271):11-18, 1985.
20. Kuhn, F. E., and S. R. Max. Testosterone and muscle hypertrophy in female rats. *J. Appl. Physiol.* 59:24-27, 1985.
21. Lamb, D.R. Anabolic steroids and athletic performance. In: *Hormones and Sport. Serono Symposia vol. 55*, New York, Raven Press, 1989, pp. 257-273.
22. Loeb, J. N. Corticosteroids and growth. *N. Engl. J. Med.* 295:547-552, 1976.
23. Lukas, S.E. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 61-68, 1993.
24. Manso, R. Actividad biológica y mecanismo de acción de los esteroides anabólico-androgénicos. *Arch. Med Dep.* 28:373-384, 1990.
25. Max, S.R., and N.E. Rance. No effect of sex steroids on compensatory muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 56:1589-1593, 1984.
26. Mayer, M., and F. Rosen. Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol. *Am. J. Physiol* 229:1381-1386, 1975.
27. Menschikowsky, M., K. Jung, P. Junghans, K.J. Petzke, and V. Albrecht. The influence of steroid hormone and of physical exercise on protein metabolism in rats. *Exp. Clin. Endocr.* 92:341-348, 1988.
28. Mirand, E.A., A.W. Gordon, and J. Wenig. Mechanism of testosterone action in erythropoiesis. *Nature* 206:270-272, 1965.
29. Mooradian, A. D., J. E. Morley, and S.G. Korenman. Biological actions of androgens. *Endocrine Rev.* 8:1-28, 1987.

30. Morano, I. Influence of exercise and Dianabol on the degradation rate of myofibrillar proteins of the heart and three fiber types of skeletal muscle of female guinea pigs. *Int. J. Sports Med.* 5:317-319, 1984.
31. Morano, I., and H. Weicker. The influence of permanent physical stress and metandienona on the degradation of myofibrillar proteins of heart and soleus of Guinea pigs. *Arzneim. Forsch.* 35:501-503, 1985.
32. Raaka, B.M., M. Finnerty, and H.H. Samuels. The glucocorticoid antagonist 17 α -methyltestosterone binds to the 10 S glucocorticoid receptor and blocks agonistic-mediated dissociation of the 10 S oligomer to the 4 S DNA-binding subunit. *Mol. Endoc.* 3:332-341, 1989.
33. Rochefort, H., and M. García. The estrogenic and antiestrogenic activities of androgens in female target tissues. *Pharmac. Ther.* 23:193-216, 1984.
34. Rogozkin, V.A. *Metabolism of Anabolic Androgenic Steroids*; Boca Raton, Florida; CRC Press; 1991.
35. Saborido, A., J. Vila, F. Molano, and A. Megías. Effect of anabolic steroids on mitochondria and sarcotubular system of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 70:1038-1043, 1991.
36. Shephard, R.J., D. Killinger, and T. Fried. Responses to sustained use of anabolic steroids. *Br. J. Sports Med.* 11:170-178, 1977
37. Smith, D.A., and P.J. Perry. The efficacy of ergogenic agents in athletic competition. Part I: Androgenic-anabolic steroids. *Ann. Pharmacother.* 26:520-528, 1992.
38. Tingus, S.T., and R.C. Carlsen. Effect of continuous infusion of anabolic steroid on murine skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 15:485-494, 1993.
39. Tobin, C., and Y. Joubert. Testosterone-induced development of the rat levator ani muscle. *Dev. Biol.* 146:131-138, 1991.
40. Tsika, R. W., R. E. Herrick, and K. M. Baldwin. Effect of anabolic steroids on overloaded and overloaded suspended skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 63:2128-2133, 1987.
41. Vida, J. A. *Androgens and Anabolic Agents: Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, New York, 1969.
42. Viru, A. The mechanism of training effects: a hypothesis. *Int. J. Sports Med.* 5:219-227, 1984.
43. Wilson, J. D., and J.E. Griffin. The use and misuse of androgens. *Metabolism* 29:1278-1295, 1980.
44. Wilson, J.D. Androgen abuse by athletes. *Endocrine Rev.* 9:181-199, 1988.



**EFFECTOS TRÓFICOS E INTERACCIÓN
CON EL ENTRENAMIENTO DE AGONISTAS
HORMONALES ANABOLIZANTES II:
AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS, CLENBUTEROL**

*Fernández, E.¹
Hernando, R.¹
Ferrández, M^a D.²
Manso, R.¹*

Dirección para correspondencia:

Rafael Manso
Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"
Universidad Autónoma de Madrid
Cantoblanco, 28049 Madrid
Tel.: 91 397 48 71
Fax: 91 397 47 99

¹ Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid.

² Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid.



Rafael Manso Martínez, es Dr. en Ciencias Naturales por la Universidad de Tübingen (Alemania) y Dr. en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid, de la que es actualmente Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular. Ha sido director del Instituto de Ciencias de la Educación Física y del Deporte del Consejo Superior de Deportes y miembro del Comité de Expertos en Investigación en Materia Deportiva del Comité para el Desarrollo del Deporte del Consejo de Europa, entre 1988 y 1990. Dirige en la actualidad un grupo de investigación dedicado al estudio de la importancia del sistema endocrino y de la respuesta celular de estrés en la adaptación al entrenamiento, en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), en la U. Autónoma de Madrid.

Raquel Hernando Sebastián, es Licenciada en Ciencias Biológicas y realiza su tesis doctoral sobre la inducción de proteínas de estrés por el ejercicio y su modulación por el entrenamiento y la modificación endocrina en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM).

Esther Fernández Rodríguez, es Licenciada en Ciencias Biológicas y realiza su tesis doctoral sobre el efecto de los esteroides anabólico-androgénicos sobre las respuestas adaptativas al entrenamiento en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM).

M.^ª Dolores Ferrández Ortiz, es Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid y ha realizado su trabajo de tesis doctoral sobre las modificaciones en la respuesta inmune producidas por el ejercicio físico en la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. Complutense de Madrid.

Resumen: El objetivo de este estudio fue analizar los efectos tróficos del agonista β 2-adrenérgico clenbuterol sobre diversos tipos de músculo esquelético, el miocardio, y otros órganos no musculares, así como las interacciones del tratamiento con el ejercicio, considerando dos situaciones diferentes de acondicionamiento físico previo e intensidad del entrenamiento. El clenbuterol presentó un efecto miotrófico ascendente en el orden $\text{sóleo} < \text{tibial} < \text{EDL}$, obteniéndose en este último caso incrementos de la masa muscular del orden del 25% ($p < 0,01$). En los músculos formados preferentemente por fibras rápidas, como el EDL, la participación en el programa de entrenamiento no afectó a la manifestación de la hipertrofia muscular. Por el contrario, en el músculo sóleo, formado casi exclusivamente por fibras de contracción lenta, el ejercicio programado anuló la manifestación de los efectos anabolizantes del clenbuterol, lo que parece ser consecuencia de la menor magnitud del efecto miotrófico inducido por el clenbuterol en este músculo y de la mayor sensibilidad de éste al entrenamiento. El clenbuterol también incrementó el peso relativo del miocardio de animales sedentarios de manera significativa (11%, $p < 0,05$), como también lo hizo el entrenamiento (12%, $p < 0,01$). Sin embargo, en los animales ejercitados tampoco se apreciaron efectos estadísticamente significativos debidos al tratamiento, lo que evidencia la analogía de la respuesta del miocardio y del músculo sóleo al tratamiento con clenbuterol. Este tratamiento redujo el peso del timo hasta aproximadamente un 20% del valor de los controles sin tratar. Aunque este porcentaje aumentó en los grupos ejercitados como consecuencia de la disminución del peso del timo por el ejercicio, los pesos medios de este órgano en todos los grupos tratados fueron similares. Del conjunto de estos datos se sugiere que el clenbuterol y el entrenamiento podrían actuar a través de un mecanismo común en la inducción de algunos de sus efectos tróficos.

Palabras clave: Ratas Wistar macho, agonistas β -adrenérgicos, clenbuterol, entrenamiento en tapiz rodante, hipertrofia muscular.

INTRODUCCION

La actividad contráctil muscular depende de la utilización de ATP como combustible metabólico inmediato. Por diferentes razones, dependientes de su naturaleza química, la concentración de ATP en la célula es muy limitada, por lo que existen mecanismos de reposición que permiten regenerar el ATP a medida que es consumido. El paso de la situación de reposo a la de actividad contráctil intensa supone incrementos en la velocidad de consumo del ATP muscular (y por lo tanto de su regeneración) de hasta 300 veces, que frecuentemente tienen que establecerse en fracciones de segundo (1). Este hecho pone en evidencia la existencia de un mecanismo de regulación que actúa de forma extraordinariamente rápida para acomodar la producción de ATP a las necesidades metabólicas, y que se dispara al iniciarse la actividad muscular.

Simultáneamente a la activación de la contracción del músculo, se inicia la respuesta simpática, controlada por el centro autónomo del hipotálamo (2). La activación del sistema nervioso simpático, como respuesta a la situación de estrés que supone la actividad física, induce una serie de cambios metabólicos y endocrinos tendentes a facilitar al organismo el oxígeno y los nutrientes necesarios para la provisión de energía para el músculo. Las catecolaminas noradrenalina y adrenalina, producidas en las terminaciones nerviosas catecolaminérgicas y en la médula adrenal, son un elemento fundamental de la respuesta del organismo a la iniciación del ejercicio físico. Las neuronas simpáticas adrenérgicas y las células cromafines de la médula adrenal actúan de forma complementaria en la respuesta de estrés, con la secreción de la médula adrenal bajo control de los nervios simpáticos. La médula adrenal actúa como un transductor neuroendocrino que transforma una señal nerviosa, la acetilcolina que se libera en las terminaciones de los nervios espláncnicos, en una señal endocrina, las catecolaminas. Debido a la doble vía de producción de las catecolaminas, hay órganos que se estimulan doblemente como preparación para la respuesta del organismo al comienzo de la actividad física intensa. Aunque los órganos no inervados solo pueden responder por la llegada de las catecolaminas a través de la sangre (estimulación hormonal), en los órganos que están inervados por neuronas simpáticas postganglionares, que en su mayoría utilizan noradrenalina, esta catecolamina actúa de forma rápida al ser liberada de las terminaciones nerviosas, como efecto previo a la acción que realizarán las catecolaminas adrenales que acceden por vía sanguínea. El efecto de la noradrenalina liberada en las terminaciones nerviosas es breve, como consecuencia de su rápida desaparición por recaptación presináptica y difusión. Las catecolaminas secretadas a la sangre por la médula adrenal, sin embargo, actúan de forma más prolongada, hasta que son destruidas en el interior de los tejidos (sobre todo en el hígado).

Las catecolaminas desempeñan importantes funciones fisiológicas relacionadas con el control cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal y visceral, así como con el control emocional y de la atención. Juegan un papel fundamental en la distribución del riego sanguíneo según las necesidades del organismo, manteniendo siempre el riego preferencial del cerebro y el corazón. Durante el ejercicio se produce vasodilatación en el músculo esquelético, que se compensa con vasoconstricción en zonas menos comprometidas, y se estimula la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la lipólisis, como principales procesos. Aunque ambas catecolami-

nas tienen efectos similares en el organismo, el grado de intensidad con que los manifiestan es diferente. La adrenalina tiene mayor actividad como estimulante cardíaco que la noradrenalina, aunque es un vasoconstrictor menos eficaz. Además la adrenalina tiene un efecto metabólico tisular mucho más acusado que el de la noradrenalina, pudiendo llegar a duplicar el metabolismo basal e incrementar considerablemente la glucogenolisis hepática y muscular. La acción concertada de las catecolaminas incrementa el riego sanguíneo en los músculos y en el cerebro y aumenta la disponibilidad de sustratos energéticos para su utilización en la producción del ATP necesario para la actividad contráctil muscular.

Las catecolaminas inician sus efectos en la célula uniéndose a receptores situados en la membrana plasmática. Existen dos tipos básicos de receptores adrenérgicos, que se diferencian por el tipo de respuesta que inducen, los agonistas y antagonistas a que son sensibles y su localización. Los receptores α suelen inducir respuestas excitadoras y producen un efecto constrictor en el músculo vascular, uterino e intestinal al activarse por unión de un agonista, variando la actividad de los efectores en el siguiente orden: adrenalina > noradrenalina > isoproterenol. Los receptores β están asociados a la adenilato ciclasa y su activación aumenta los niveles del AMP cíclico, que actúa como segundo mensajero. Por lo general inducen respuestas inhibitoras en el músculo liso pero estimuladoras en el miocardio y responden a la unión de agonistas por el siguiente orden de intensidad isoproterenol > adrenalina > noradrenalina. Aunque en su distribución tisular suele observarse predominio de alguno de los tipos, ninguno de ellos es específico por lo que suelen encontrarse ambos en numerosos órganos.

Basándose en su perfil farmacológico, cada uno de estos tipos de receptores puede subdividirse dando lugar a cuatro subtipos diferentes α_1 , α_2 , β_1 y β_2 , que están codificados por diferentes genes (3,4). El subtipo α_1 se localiza principalmente en zonas postsinápticas y media un efecto vasoconstrictor, mientras que el α_2 puede localizarse en terminaciones presinápticas, en donde actuaría en el control de la liberación de noradrenalina en los nervios simpáticos, o en zonas postsinápticas mediando un efecto vasoconstrictor. El subtipo β_1 interviene en el control de la velocidad e intensidad del latido cardíaco, y el β_2 interviene en la relajación del músculo liso vascular, uterino y bronquial. Se ha descrito un tercer subtipo de receptor β -adrenérgico, el β_3 , localizado inicialmente en el tejido adiposo marrón y caracterizado posteriormente en el músculo esquelético (5), que media la lipólisis y la termogénesis en los adipocitos y en el músculo esquelético.

Los receptores adrenérgicos detectados en músculo esquelético son principalmente del subtipo β_2 , con mayor afinidad por adrenalina que por noradrenalina (6). Como ocurre en otros tejidos, el número de receptores presentes en la membrana está sometido a regulación por exposición a agonistas β -adrenérgicos (7). Otros mecanismos de regulación de este receptor implican control neural, hormonal (por hormonas tiroideas y glucocorticoides) y por la condición física (8).

Debido a la importancia de los efectos que inducen las catecolaminas, se han diseñado numerosas drogas capaces de interferir los procesos de biosíntesis, recaptación en las células nerviosas o degradación, o que son capaces de unirse específicamente a alguno de los subtipos de receptores actuando de forma mimética (agonistas) o antagonizando (antagonistas o bloqueantes) el efecto de las

catecolaminas en el tejido. Como algunas neuronas del sistema nervioso, responsable último de la coordinación funcional del organismo, utilizan catecolaminas como neurotransmisores, los compuestos que interfieren la actividad de las catecolaminas, tanto por estimulación como por inhibición de funciones neurales, pueden producir cambios profundos en el comportamiento del individuo. Algunos trastornos relacionados con la actividad nerviosa, tales como la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson o la depresión profunda, han sido tratados utilizando compuestos que interfieren con la actividad de las catecolaminas. Algunas aminas simpaticomiméticas, compuestos con propiedades análogas a las catecolaminas, pero con efectos parciales sobre alguna función fisiológica más acusados, tienen uso terapéutico como broncodilatadores, estimulantes cardíacos o descongestionantes nasales.

Además de su actividad terapéutica, entre los compuestos que interfieren la actividad de las catecolaminas se encuentra un amplio número de sustancias que han sido utilizadas en medios deportivos con la finalidad de incrementar el rendimiento en la competición. Estos compuestos se incluyen en el grupo de los psicoestimulantes y en el de los bloqueantes β -adrenérgicos (una panorámica general sobre estos compuestos, su mecanismo de acción y su utilización en medios deportivos se da en la referencia 9). Los bloqueantes β -adrenérgicos o β -bloqueantes, contrarrestan los efectos periféricos cardiovascular y metabólico de la noreadrenalina, por lo que se utilizan para combatir la hipertensión, la angina de pecho y arritmias. En el deporte se utilizan porque previenen los estados de excitación nerviosa y las palpitaciones que suelen preceder a la competición y que tienen su origen en un incremento excesivo de la actividad simpática. Por incrementar la capacidad de concentración y reducir la ansiedad precompetitiva su uso ha resultado efectivo en deportes de coordinación mano-pie-ojos tales como golf, pruebas de puntería, hípica y saltos de esquí. Sin embargo, en pruebas de potencia o resistencia, en las que se exige un elevado gasto cardíaco y muscular, su uso resulta perjudicial.

En época más reciente han comenzado a utilizarse algunos agonistas β -adrenérgicos con la intención de incrementar el rendimiento deportivo, incorporándose así al grupo de los derivados hormonales usados en el deporte como anabolizantes. Algunos agonistas β -adrenérgicos, como el isoproterenol, se unen tanto a receptores β_1 como a β_2 , por lo que sus efectos son poco selectivos, mientras que otros presentan una actividad de unión preferencial a uno de los dos subtipos de receptores. El clenbuterol, por ejemplo, presenta una selectividad elevada para receptores β_2 , los dominantes en músculo esquelético.

Cuando se suministran a animales de experimentación agonistas β_2 -adrenérgicos, se incrementa la proporción de proteína en el músculo esquelético (10). Esta actividad anabolizante muscular ha estimulado el interés en estos compuestos como agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de estados con balance negativo de nitrógeno. La posibilidad de una utilización terapéutica de los agonistas β_2 -adrenérgicos se ha visto estimulada por la observación de que estos compuestos presentan pocos efectos secundarios apreciables y son capaces de inhibir o revertir la atrofia muscular que se produce en modelos animales de trastornos tales como la desnervación, la distrofia muscular genética y la malnutrición, entre otros.

El clenbuterol es uno de los agonistas β -adrenérgicos con mayor actividad como anabolizante (11). La administración de este compuesto en la dieta induce una respuesta anabólica muscular (12), que se manifiesta como hipertrofia de ambos tipos de fibras, lentas y rápidas (13), como consecuencia de una disminución en la velocidad de degradación de proteínas sin que se modifique considerablemente su velocidad de síntesis (12). Las respuestas al clenbuterol de los músculos inervados y desnervados experimentalmente parecen diferentes ya que este compuesto es capaz de mejorar o revertir la atrofia inducida por desnervación del músculo sóleo principalmente gracias a un aumento en la síntesis proteica (14). Sin embargo, los músculos formados preferentemente por fibras de contracción rápida, tales como el extensor de los dedos largos (EDL) parecen responder de manera diferente al sóleo al tratamiento con clenbuterol, lo que es un ejemplo más de la diversidad de las respuestas de los dos tipos de músculo a un variado tipo de estímulos.

A la vista de estos antecedentes, como paso previo a la caracterización de los cambios bioquímicos que el clenbuterol pudiera inducir en diferentes componentes funcionales musculares y no musculares, hemos estudiado los efectos de este agonista β_2 -adrenérgico sobre la ganancia de peso corporal y el peso de diferentes tipos de músculo esquelético, miocardio, y de otros órganos corporales, analizando además la interacción del tratamiento con dos situaciones diferentes de ejercicio continuado, en animales sin entrenamiento previo, durante las 2 primeras semanas de aplicación de un programa de entrenamiento de alta intensidad y 3 meses de duración, o en animales que ya están finalizando el programa de entrenamiento, durante las dos últimas semanas de aplicación del mismo. Un objetivo adicional de este estudio fué comparar estos efectos con los inducidos por anabolizantes esteroidicos, que han sido también estudiados en el laboratorio, tratando de establecer criterios indicativos de la existencia, o no, de un mecanismo de actuación común entre ambos grupos de compuestos. Los datos obtenidos han puesto de manifiesto que el clenbuterol, en contra de lo que ocurría con los anabolizantes esteroidicos, manifiesta su actividad miotrófica en individuos sedentarios, con grados de intensidad mayores en músculos formados por fibras rápidas que en los constituídos fundamentalmente por fibras lentas. El ejercicio no parece interferir las respuestas inducidas por el clenbuterol, aunque puede ocultar la moderada respuesta miotrófica de los músculos lentos al agonista β_2 -adrenérgico, a medida que empiezan a manifestarse en éstos los efectos tróficos del entrenamiento

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación. Se utilizaron 36 ratas Wistar macho con 5-6 semanas de edad y con un peso medio de 166 ± 11 g al iniciarse las sesiones de entrenamiento en los grupos ejercitados. Los animales se criaron en el estabulario del Centro de Biología Molecular en la Universidad Autónoma de Madrid, donde se mantuvieron en un ambiente controlado con una temperatura de $22-24^\circ\text{C}$, una humedad relativa del 50-60% y una periodicidad luz-oscuridad de 12 horas. Se alojaron en grupos homogéneos de 6 animales por jaula (dimensiones 59 x 39 x 20 cm), según los tratamientos, con aporte de agua y comida *ad libitum*. La manipulación de los animales para su pesado (3 veces/semana) y entrenamiento (5

días/semana) se realizó sistemáticamente entre la 9 y las 12 de la mañana, mientras que el tratamiento con clenbuterol se realizó 2 veces al día, después de la sesión de entrenamiento y entre las 5 y las 7 de la tarde. Tras el período de pre-entrenamiento, se establecieron dos grupos, uno de ellos ($n=24$) formado por los animales que permanecieron en reposo por el momento (S, sedentario), y un segundo grupo ($n=12$) formado por los animales que iniciaron el programa de entrenamiento de 13 semanas en tapiz rodante (E). Transcurridas 11 semanas, cuando las ratas tenían 15 semanas y pesaban 464 g como media, las ratas entrenadas se subdividieron en 2 grupos de 6 animales, un grupo sin tratar (E-13c) y el otro tratado con clenbuterol (E-13cl), y ambos continuaron el programa de entrenamiento. Las ratas sedentarias se separaron en cuatro grupos, dos que realizaron las primeras semanas del programa de entrenamiento, uno sin tratamiento con clenbuterol (E-2c) y el otro tratado (E-2cl), y otros dos de ratas que permanecieron sedentarias hasta su sacrificio, uno sin tratamiento con clenbuterol (Sc) y con tratamiento el otro (Scl).

Tratamientos y entrenamiento en tapiz rodante. El clenbuterol (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo., USA), se preparó diariamente disolviéndolo en solución salina fisiológica, se esterilizó por filtración a través de un filtro de membrana y se inyectó por vía subcutánea, 2 veces al día durante 14 días consecutivos, a una dosis total de 2 mg/kg/día. Los controles sin tratar recibieron una inyección subcutánea del volumen correspondiente de una solución salina fisiológica estéril. La última sesión de entrenamiento se realizó 48h antes del sacrificio de los animales y la última administración de clenbuterol 16h antes. Las ratas se ejercitaron en una cinta rodante (mod. Li 8706, Letica Scientific Instruments, Barcelona) que permite la regulación continua de la pendiente y la velocidad de carrera y dispone de una unidad de control que proporciona corriente para la rejilla eléctrica utilizada para estimular el ejercicio, a una intensidad regulable, y permite controlar el tiempo de permanencia bajo shock eléctrico. El programa de entrenamiento que se aplicó, 13 semanas de duración, cinco días por semana (tabla 1), se corres-

Semana (nº)	Duración (min.)	Vel. (m/min)	Pte (%)
1	30	20	0
2	35	20	8
3	40	20	8
4	40	21	8
5	45	21	12
6	45	22	12
7	50	22	12
8	50	22	16
9	55	23	16
10	55	23	16
11	55	23	16
12	60	24	16
13	60	24	16

TABLA 1. Detalle del programa de entrenamiento en tapiz rodante utilizado en los experimentos.

ponde con el entrenamiento de alta intensidad que se aplicó previamente en el laboratorio en el estudio de los efectos tróficos de anabolizantes esteroídicos, con la salvedad de que la pendiente no se incrementó por encima del 16% para garantizar un seguimiento más uniforme del programa de entrenamiento por todos los animales. No obstante, en la etapa final del entrenamiento, en los casos aislados en que algún animal se fatigaba antes de finalizar la sesión de entrenamiento, ésta se interrumpió de manera individualizada para estos animales.

Extracción y análisis de los tejidos. Al finalizar el programa de entrenamiento, 48 h después de la última sesión, las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de 50 mg/Kg de Pentothal (thiopental sódico, Abbott). Tras la disección rápida *in vivo* de varios músculos de las patas traseras (Extensor de los dedos largos, EDL; Tibial, TA y Sóleo, SO), se hizo una perfusión hepática con 15 ml de solución salina fisiológica fría, se extrajo el hígado y se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se extrajo entonces rápidamente el corazón y los riñones, el timo, el bazo y las adrenales. Antes de congelar en nitrógeno líquido, los órganos se lavaron pasándolos por solución salina fisiológica fría, se secaron por contacto con papel de cromatografía 3MM (Whatman) y se pesaron. Los tejidos congelados se conservaron a -80 °C para la realización posterior de análisis bioquímicos.

Análisis estadístico. Los datos se expresaron como valores promedio \pm desviación estándar del número de animales que se indica en cada caso en las leyendas de las figuras o de las tablas. El análisis estadístico se realizó mediante regresión múltiple con variables dicotómicas. Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando el test de la t de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$, y muy significativas cuando $p < 0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de 2 semanas tratamiento con el agonista β_2 -adrenérgico clenbuterol sobre la ganancia de peso corporal y el peso del hígado y el riñón en animales sedentarios o que realizan ejercicio programado, en dos situaciones diferentes de condición física e intensidad de entrenamiento. En la tabla 2 se representan las medias de los valores absolutos de las ganancias de peso, junto con los de los pesos de hígado y riñón, así como los correspondientes valores referidos al peso corporal (el peso inicial, en el caso de los valores de ganancia relativa de peso, y peso del animal en el momento del sacrificio, en los demás casos), en ratas Wistar macho sin tratar o que han sido tratadas con clenbuterol a una dosis de 2 mg/kg/día (en dos inyecciones diarias) durante 14 días, sedentarias o sometidas a actividad física programada, en dos situaciones previas diferentes de acondicionamiento físico y con intensidades de entrenamiento diferentes. Dos de los grupos de ratas ejercitadas, que no habían realizado actividad física previa antes de comenzar el programa de entrenamiento, a excepción del periodo de tiempo necesario para su adiestramiento en el funcionamiento del tapiz rodante, ejecutaron las dos primeras semanas del programa, un grupo en presencia de clenbuterol y el otro en su ausencia (E2). Los otros dos grupos de ratas entrenadas realizaron el programa de entrenamiento hasta el comienzo de la

	SEDENTARIOS		ENTRENADOS (E2)		ENTRENADOS (E13)	
	CONTROL	CL	CONTROL	CL	CONTROL	CL
Peso (Pt, g)	491 \pm 25	503 \pm 54	468 \pm 29	479 \pm 31	468 \pm 19	471 \pm 21
(Pt-Po)/Po ¹	2,61 \pm 0,58	2,59 \pm 0,45	2,48 \pm 0,28	2,59 \pm 0,31	2,32 \pm 0,24	2,32 \pm 0,40
RIÑÓN						
P. húmedo, g	1,43 \pm 0,49	1,45 \pm 0,13	1,47 \pm 0,13	1,37 \pm 0,13	1,47 \pm 0,04	1,44 \pm 0,11
P. Rel. (mg/g) ²	2,92 \pm 0,43	2,95 \pm 0,36	3,10 \pm 0,28	2,90 \pm 0,28	3,28 \pm 0,18	2,97 \pm 0,24
HIGADO						
P. húmedo, g	20,3 \pm 3,8	20,0 \pm 2,5	20,1 \pm 4,9	18,1 \pm 2,4	20,5 \pm 2,4	19,1 \pm 3,4
P. Rel. (mg/g) ²	41,4 \pm 8,5	40,5 \pm 4,5	42,8 \pm 8,0	37,6 \pm 5,4	44,5 \pm 3,4	40,1 \pm 5,9

¹ La ganancia de peso corporal (Pt-Po) se representa referida al peso corporal inicial (Po);
² Peso húmedo (mg) referido al peso corporal (g). Se representan las medias \pm desviación estándar de datos de 11-12 animales en los grupos sedentarios y de 5-6 animales en los grupos entrenados. Como los dos riñones se han considerado independientemente, el número de muestras de este órgano es el doble del número de animales utilizados en el estudio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

TABLA 2. Ganancia de peso corporal y pesos de hígado y riñón en ratas sedentarias o sometidas a un programa de entrenamiento en tapiz rodante durante las 13 semanas de duración del mismo (E13) o solamente durante las dos primeras semanas (E2), en ausencia de tratamiento (control) o tras administrar una dosis diaria de 2 mg/kg de clenbuterol (CL) coincidiendo con las dos primeras semanas (E2) o durante las dos últimas semanas del programa (E13).

semana 12^a, momento en el que se inició el tratamiento con clenbuterol en uno de los grupos, mientras que al otro se le inyectó solución salina fisiológica, y ambos continuaron el entrenamiento hasta finalizar las 13 semanas del programa (E13).

Como puede observarse en esta tabla, coincidiendo con lo que ya se había observado tras la aplicación de un programa de entrenamiento similar, en conjunción con el tratamiento con esteroides anabólico-androgénicos, el entrenamiento de alta intensidad no redujo significativamente el peso medio de los animales después de tres meses de aplicación del programa (E13), aunque se observa una tendencia en este sentido que se manifiesta en una disminución de las ganancias de peso del orden del 5% en los valores medios. Esta diferencia aumenta hasta más del 10%, sin todavía alcanzar la significación estadística, cuando se consideran las ganancias referidas al peso inicial de los animales. Sin alcanzar tampoco la significación estadística, esta misma situación se observa en los animales que han realizado solamente las dos primeras semanas del programa de entrenamiento. (tabla 2, E2), lo que indica que se trata de un efecto ligero, que se manifiesta a las pocas semanas de iniciarse la actividad física pero que no progresa a lo largo del programa de entrenamiento de alta intensidad.

El tratamiento de 14 días con clenbuterol no modificó la ganancia de peso corporal de forma significativa. Tanto si se consideran los valores absolutos como las ganancias referidas al peso corporal en el momento del sacrificio, no se observaron diferencias entre los valores medios de los animales tratados con clenbuterol y los controles sin tratar, ni en los animales sedentarios ni en los ejercitados, con independencia de la situación de acondicionamiento físico previo. Nuestros datos contrastan con observaciones anteriores en relación a la ganancia de peso corporal en animales tratados con agonistas β -adrenérgicos. Emery y cols. (10), han descrito un incremento significativo de la ganancia de peso corporal y de la masa del músculo gastrocnemio, sin afectar al contenido de grasa corporal, en ratas tratadas durante 16-19 días con una dosis diaria de 2 mg/kg de clenbuterol o fenoterol, en dos inyecciones diarias por vía subcutánea, condiciones que coinciden con las utilizadas en este trabajo, con la excepción de que en lugar de utilizar triacilglicéridos de cadena media, como vehículo se empleó solución salina fisiológica. Los datos de ganancia de peso corporal que se dan en éste trabajo se refieren al incremento de peso experimentado por los animales en los tres meses, para incluir también posibles efectos de los dos niveles de entrenamiento, además de los del clenbuterol, así como las correspondientes interacciones. Aunque en el momento en que se seleccionaron los animales, la dispersión del peso medio era pequeña, ésta aumenta con el tiempo debido a la manifestación de las diferencias interindividuos, lo que podría ser la causa de que no se observe el efecto del clenbuterol sobre el peso corporal. Sin embargo, como se indica más adelante, se ha observado con toda claridad el efecto miotrófico, lo que indica que éste puede producirse sin aumento aparente del peso de los animales, sugiriéndose que debe ser a costa de otro componente corporal, probablemente la grasa. En el músculo sóleo se ha apreciado una disminución considerable de los depósitos grasos (13), lo que podría reflejar un proceso general de cambio de la composición corporal inducido por los agonistas β -adrenérgicos, incrementando la masa magra a costa del contenido graso (15, 16) aunque no parece general para todos ellos ya que no se ha observado en ratas tratadas con clenbuterol (10). Lamentablemente no se dispone de datos de composición corporal para confirmar este extremo.

La aplicación del programa de entrenamiento, en los diferentes niveles, tampoco modificó de manera estadísticamente significativa el peso del hígado o del riñón. En el caso del riñón, se había observado previamente que la aplicación de un programa de entrenamiento aeróbico, pero no la aplicación de un programa de entrenamiento de alta intensidad similar al utilizado en estos experimentos, aunque todavía más intenso, incrementaba significativamente el peso de este órgano cuando los valores se expresaban en relación al peso corporal. Coincidiendo con estas observaciones, ya a las dos semanas de aplicación de este programa de entrenamiento se manifiesta una tendencia (con un aumento del 6% en el peso relativo del riñón), que todavía aumenta hasta aproximadamente un 10%, aunque sin llegar a dar diferencias significativas, al final del entrenamiento. Como estas diferencias se observan en los pesos relativos pero no en los valores absolutos, estos datos sugieren que el aumento del peso relativo del riñón inducido por el entrenamiento aeróbico, que no alcanza significación estadística en el ejercicio de de alta intensidad, está asociado a la disminución del peso corporal. El clenbuterol no manifestó efecto renotrófico y, en los animales tratados con clenbuterol desaparece la tendencia a aumentar el peso relativo del riñón, lo que indica que el tratamiento con clenbuterol actúa invirtiendo la tendencia del entrenamiento, probablemente como consecuencia de su efecto anabólico muscular que impide la bajada (aunque no significativa estadísticamente) del peso corporal.

En el caso del hígado tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, ni como consecuencia de la aplicación del programa de entrenamiento en sus diferentes niveles, ni por los tratamientos con clenbuterol.

Efecto de 2 semanas tratamiento con el agonista β 2-adrenérgico clenbuterol sobre el peso de diversos músculos de las patas taseras y del miocardio en animales sedentarios o sometidos a entrenamiento, en dos situaciones diferentes de condición física previa e intensidad de entrenamiento. En la figura 1 se representan los valores medios de los pesos húmedos y pesos relativos (pesos referidos al peso corporal en el momento del sacrificio) del músculo extensor de

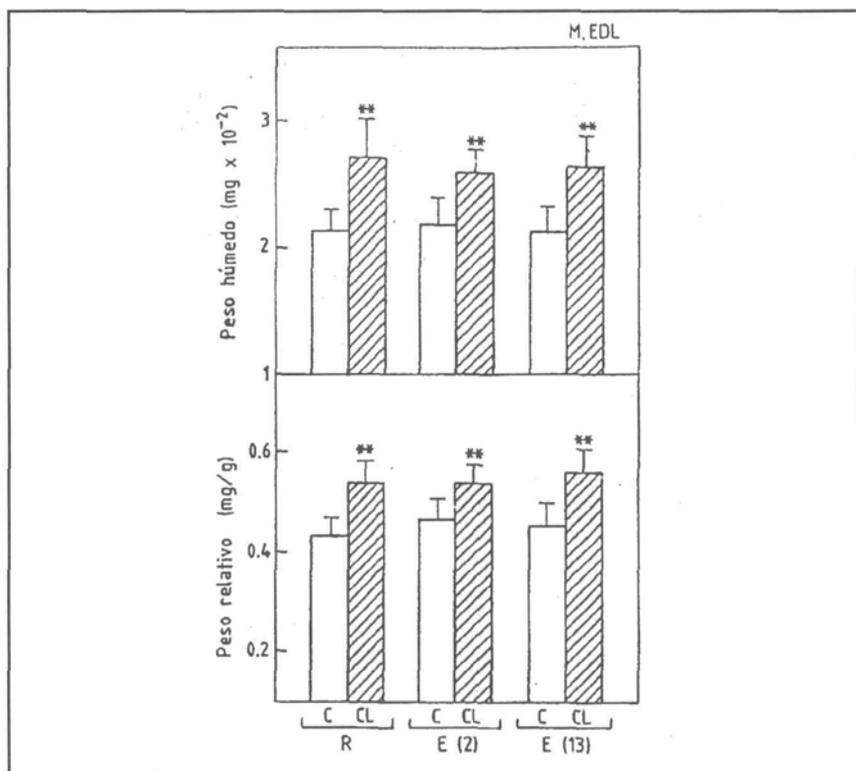


Figura 1. Efecto del tratamiento con el agonista β 2-adrenérgico clenbuterol sobre la masa de músculo extensor de los dedos largos (EDL) en ratas sedentarias o sometidas a ejercicio crónico en dos situaciones de acondicionamiento físico previo e intensidad del entrenamiento. El clenbuterol se administró por vía subcutánea, en dos inyecciones diarias de 1 mg/kg cada una, durante 14 días consecutivos. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos de los músculos en mg o de estos valores referidos al peso corporal (peso relativo, mg/g) de los grupos de animales sedentarios (R, reposo, n=10-11 por grupo) o sometidos a ejercicio crónico (n=4-6 por grupo), durante dos semanas, las iniciales del programa de entrenamiento (E2), o durante las 13 semanas de duración del mismo (E13), en ausencia (Control, C) o tras administrar el clenbuterol durante las dos semanas anteriores al sacrificio (CL). Como los músculos de ambas patas traseras se consideraron independientemente, el número de muestras por grupo es el doble del número de animales. *p<0,05, **p<0,01, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar: *p<0,05, **p<0,01, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

los dedos largos (EDL), un músculo que en la rata Wistar está formado casi exclusivamente por fibras rápidas, con una proporción reducida de las de tipo oxidativo glucolítico. Contrastando con la observación realizada en experimentos precedentes de que un entrenamiento de alta intensidad, similar al que se ha aplicado aunque algo más intenso, era capaz de incrementar el peso relativo del músculo EDL (con significación estadística en el límite de lo aceptable), con la aplicación del presente programa no se han observado cambios significativos en el peso de este músculo debidos al entrenamiento. Sin embargo, el tratamiento con clenbuterol incrementó de manera muy significativa el peso del músculo, tanto si se expresa como valor absoluto como si se refiere al peso corporal en el momento del sacrificio. Este incremento, que se produjo también en los animales entrenados, sin que se observen diferencias significativas debidas a la intensidad del entrenamiento, supone aproximadamente un 25% cuando se consideran los pesos húmedos, que se reduce ligeramente cuando se comparan los pesos relativos. No obstante, como se puede apreciar en la figura las diferencias son altamente significativas en ambos casos.

El efecto del tratamiento con clenbuterol y del entrenamiento, así como de la interacción entre el tratamiento y los entrenamientos, se estudió también en el músculo tibial, también formado preferentemente por fibras de contracción rápida, pero con una mayor abundancia de fibras oxidativas. Los datos relativos a este músculo se representan en la figura 2. La aplicación completa de este programa de entrenamiento, como ya se había observado anteriormente para un programa similar, no incrementó el peso de este músculo. El clenbuterol, sin embargo, incrementó la masa muscular en aproximadamente el 10%, de manera muy significativa ($p < 0,01$) cuando se consideran los pesos húmedos y de forma significativa ($p < 0,05$, aproximadamente un 8%) cuando se analizan los pesos referidos al peso corporal. La intensidad del entrenamiento no parece afectar a la magnitud del efecto hipertrófico que induce el clenbuterol.

También se estudió el efecto del tratamiento con clenbuterol, en las diferentes condiciones de reposo o entrenamiento, sobre el músculo sóleo, un músculo que en la rata está formado casi exclusivamente por fibras de contracción lenta. Aunque el entrenamiento no llegó a incrementar el valor medio del peso húmedo del músculo sóleo de forma significativa, al cabo de las 13 semanas de entrenamiento se apreció un incremento del 7% en los valores promedio del peso muscular. Cuando se consideran los pesos referidos al peso corporal, la diferencia entre los valores medios de los grupos sedentarios y entrenados, tras las trece semanas de entrenamiento, aumentan hasta el 12,5%, resultando estadísticamente muy significativas ($p < 0,01$). Resulta interesante la conclusión que puede extraerse de esta figura de que, a medida que se van manifestando los efectos del entrenamiento sobre el músculo sóleo, van dejando de apreciarse los efectos del clenbuterol. En los animales sedentarios se observa un incremento significativo ($p < 0,05$) del 10% en el peso húmedo de este músculo por el tratamiento con clenbuterol. Esta diferencia se hace altamente significativa ($p < 0,01$) cuando se consideran los pesos relativos, a pesar de que la diferencia entre los valores medios es solo del 8%, como consecuencia de una disminución considerable en la dispersión de los datos en el grupo. Este dato puede interpretarse considerando que el músculo sóleo responde con atrofia o hipertrofia a situaciones de descarga o sobrecarga, respectivamente, y que se acomoda de forma precisa al peso corporal.

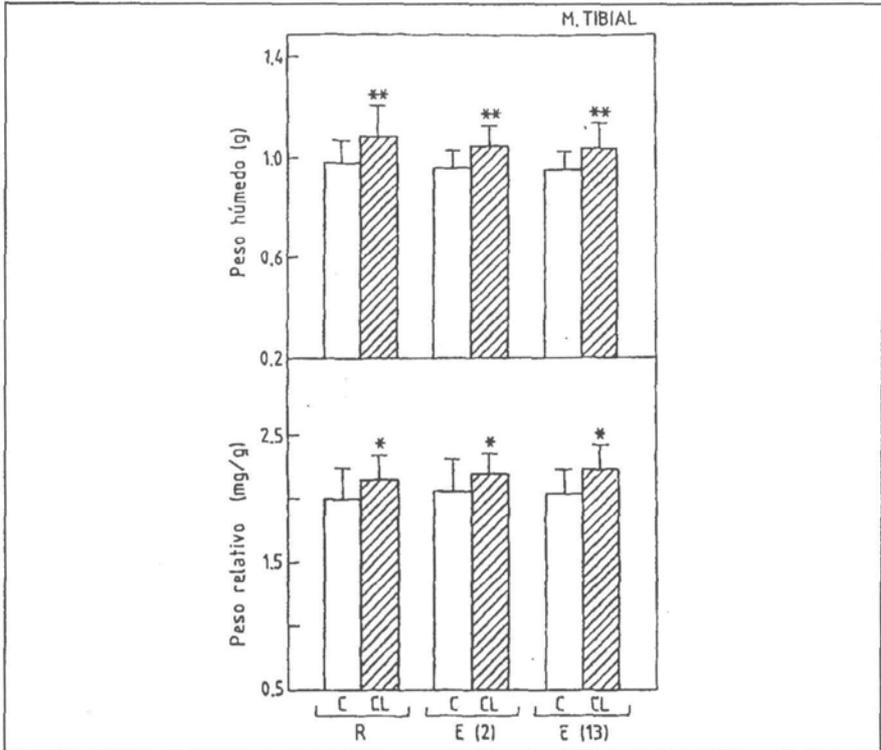


Figura 2. Efecto del tratamiento con el agonista β 2-adrenérgico clenbuterol sobre la masa del músculo tibial en ratas sedentarias o sometidas a ejercicio crónico en dos situaciones de acondicionamiento físico previo e intensidad del entrenamiento. El clenbuterol se administró por vía subcutánea, en dos inyecciones diarias de 1 mg/kg cada una, durante 14 días consecutivos. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos de los músculos en mg o de estos valores referidos al peso corporal (peso relativo, mg/g) de los grupos de animales sedentarios (R, reposo, $n=10-11$ por grupo) o sometidos a ejercicio crónico ($n=4-6$ por grupo), durante dos semanas, las iniciales del programa de entrenamiento (E2), o durante las 13 semanas de duración del mismo (E13), en ausencia (Control, C) o tras administrar el clenbuterol durante las dos semanas anteriores al sacrificio (CL). Como los músculos de ambas patas traseras se consideraron independientemente, el número de muestras por grupo es el doble del número de animales. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

Sin embargo, en los animales que realizaron ejercicio físico programado durante el tratamiento, y en los que solamente lo ejecutaron durante las dos primeras semanas del programa, desaparecieron las diferencias entre los grupos tratados con clenbuterol y sin tratar, tanto si se consideran los valores de los pesos húmedos como los de los pesos relativos. Este resultado parece ser consecuencia de la intervención de dos factores diferentes. En primer lugar, aunque los efectos del clenbuterol sobre las fibras lentas sean consistentes, la magnitud de este efecto es pequeña si se compara con lo que ocurre en músculos formados por fibras rápidas (véase fig.1). Por otro lado, los efectos anabólicos del entrenamiento en tapiz rodante sobre el músculo esquelético parecen afectar más apreciablemente al músculo sóleo que a

músculos formados por fibras rápidas. En los animales entrenados, al producirse una hipertrofia del músculo sóleo por el ejercicio, por pequeña que ésta pueda parecer, es suficiente para que los efectos del clenbuterol dejen de manifestarse con significación estadística ya que éstos no parecen ser aditivos a los del entrenamiento. Esto permitiría interpretar la desaparición del efecto del clenbuterol tras dos semanas de entrenamiento. Los efectos del entrenamiento sobre el peso relativo del músculo sóleo, tras las 13 semanas de aplicación del programa (12,4%, $p < 0,01$), también se manifestaron en animales tratados durante las dos últimas semanas con clenbuterol (7% sobre el peso medio del músculo sóleo de los animales sedentarios igualmente tratados, $p < 0,05$). Sin embargo dejan de apreciarse diferencias significativas debidas al tratamiento con clenbuterol (fig. 3). Estos datos indican que el

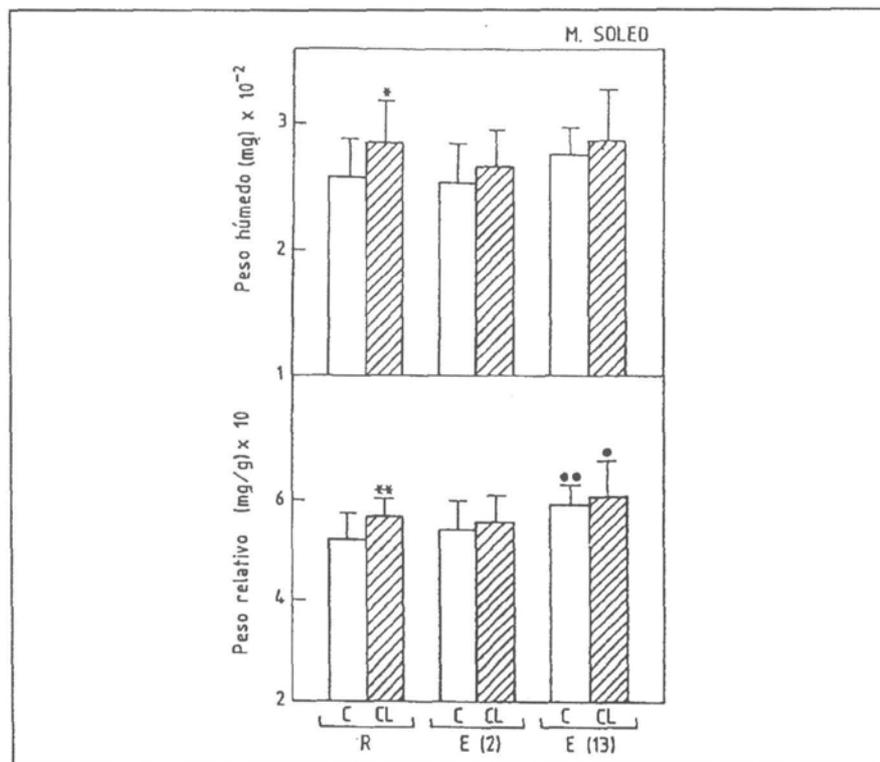


Figura 3. Efecto del tratamiento con el agonista β_2 -adrenérgico clenbuterol sobre la masa de músculo sóleo en ratas sedentarias o sometidas a ejercicio crónico en dos situaciones de acondicionamiento físico previo e intensidad del entrenamiento. El clenbuterol se administró por vía subcutánea, en dos inyecciones diarias de 1 mg/kg cada una, durante 14 días consecutivos. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos de los músculos en mg o de estos valores referidos al peso corporal (peso relativo, mg/g) de los grupos de animales sedentarios (R, reposo, $n=10-11$ por grupo) o sometidos a ejercicio crónico ($n=4-6$ por grupo), durante dos semanas, las iniciales del programa de entrenamiento (E2), o durante las 13 semanas de duración del mismo (E13), en ausencia (Control, C) o tras administrar el clenbuterol durante las dos semanas anteriores al sacrificio (CL). Como los músculos de ambas patas traseras se consideraron independientemente, el número de muestras por grupo es el doble del número de animales. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar. • $p < 0,05$, •• $p < 0,01$, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

efecto inducido en el músculo sóleo por el tratamiento con clenbuterol y el que induce el entrenamiento no son aditivos. El análisis realizado por Maltin y cols. (13) sobre los efectos del clenbuterol sobre la frecuencia de fibras y el área de los músculo sóleo y EDL de ratas macho Hooded-Lister de la estirpe Rowett, ha puesto de manifiesto que el clenbuterol actúa de manera diferencial sobre las fibras rápidas y las lentas, aumentando la sección trasversal de las fibras lentas a los cuatro días de tratamiento, cuando todavía no se apreciaron los efectos sobre las fibras rápidas, situación que se invirtió tras 21 días de tratamiento. Quizás esta diversidad de respuesta dependiente del tipo de fibra sea una de las causas de que en este trabajo, tras 2 semanas de administración de clenbuterol por vía subcutánea, se haya observado una hipertrofia muscular mucho más acusada para el músculo EDL que para el sóleo o el tibial. El fundamento molecular de la diferente sensibilidad de las fibras rápidas y lentas constituye un problema de indudable interés, que espera investigación en el futuro. Estos datos podrían interpretarse al menos parcialmente asumiendo que el clenbuterol y el entrenamiento probablemente comparten la ruta de señalización que induce la respuesta hipertrófica de las fibras lentas pero no de las rápidas.

Las consideraciones que se acaban de realizar en relación a los efectos del clenbuterol y del entrenamiento sobre las fibras lentas del músculo sóleo, parecen poderse extender a las fibras musculares cardíacas. En la figura 4 se dan los datos de los efectos de los diferentes niveles de actividad física y del tratamiento con clenbuterol sobre los pesos húmedos y pesos relativos del miocardio. Se observa una gran similitud con los datos correspondientes al músculo sóleo. Solamente en los animales sedentarios el tratamiento con clenbuterol resultó en un aumento estadísticamente significativo (11%, $p < 0,05$) del peso del miocardio, mientras que en los animales ejercitados los grupos de animales tratados y no tratados no mostraron diferencias estadísticamente significativas. La aplicación del programa de entrenamiento completo (E13) también incrementó el peso relativo del miocardio en los animales sin tratar (12%, $p < 0,01$) aunque, en contra de lo que se observaba en el músculo sóleo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sedentarios y entrenados tratados con clenbuterol. La interpretación de estos resultados debe hacerse probablemente en el mismo contexto de las realizadas en relación con los efectos del clenbuterol sobre el músculo sóleo.

Efecto de la administración de agonista β 2-adrenérgico clenbuterol en animales sedentarios o en dos situaciones diferentes de aplicación de un programa de entrenamiento intenso, sobre el peso de los órganos linfáticos timo y bazo y las cápsulas adrenales. Como se ha descrito anteriormente (trabajo precedente, 17), los órganos linfáticos y las glándulas adrenales resultaron extraordinariamente sensibles a los tratamientos con los anabolizantes esteroídicos estanozolol y decanoato de nandrolona, por lo que se consideró de interés estudiar también el efecto del tratamiento con clenbuterol sobre el peso de estos órganos. Como puede observarse por los datos que se representan en la tabla 3, el clenbuterol, como el entrenamiento, solo modificó el tamaño del timo, sin que se hayan observado efectos estadísticamente significativos, sobre el peso de las adrenales o del bazo. El efecto sobre el timo, en los animales sedentarios, supone una reducción en un 80% en los valores promedio del peso. El entrenamiento, al parecer de forma independiente de la intensidad, también redujo el peso del

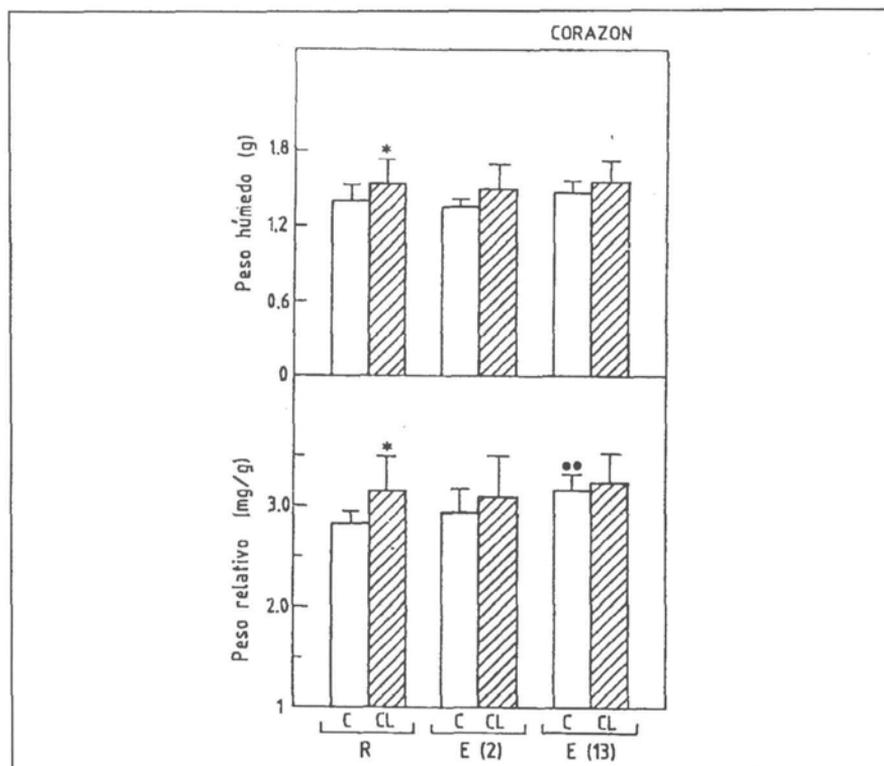


Figura 4. Efecto del tratamiento con el agonista β_2 -adrenérgico clenbuterol sobre la masa del miocardio en ratas sedentarias o sometidas a ejercicio crónico en dos situaciones de acondicionamiento físico previo e intensidad del entrenamiento. El clenbuterol se administró por vía subcutánea, en dos inyecciones diarias de 1 mg/kg cada una, durante 14 días consecutivos. Se representan los valores promedio \pm desviación estándar de los pesos de los músculos en mg o de estos valores referidos al peso corporal (peso relativo, mg/g) de los grupos de animales sedentarios (R, reposo, $n=10-11$ por grupo) o sometidos a ejercicio crónico ($n=4-6$ por grupo), durante dos semanas, las iniciales del programa de entrenamiento (E2), o durante las 13 semanas de duración del mismo (E13), en ausencia (Control, C) o tras administrar el clenbuterol durante las dos semanas anteriores al sacrificio (CL). Como los músculos de ambas patas traseras se consideraron independientemente, el número de muestras por grupo es el doble del número de animales. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, animales tratados frente a los correspondientes controles sin tratar: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

timo en aproximadamente un 50%, pero este efecto no fué aditivo al del clenbuterol. Esto sugiere que el entrenamiento y el clenbuterol podrían actuar sobre el timo por mecanismos coincidentes, sugiriéndose la participación de los receptores β_2 -adrenérgicos en algunas de las respuestas fisiológicas al ejercicio.

Merece la pena resaltar que, como se deduce de la comparación de los efectos del clenbuterol con los de los anabolizantes esteroídicos, ambos grupos de compuestos presentan efectos similares sobre el timo, reduciendo su peso de forma dramática a valores inferiores al 20% de los controles sin tratar. La magnitud de estos efectos

	SEDENTARIOS		EJERCITADOS (E2)		EJERCITADOS (E13)	
	CONTROL	CL	CONTROL	CL	CONTROL	CL
Bazo	956 \pm 27	1058 \pm 50	1024 \pm 39	1021 \pm 47	999 \pm 12	978 \pm 6
Timo	596 \pm 53	123 \pm 34**	322 \pm 74**	109 \pm 16**	293 \pm 9**	81 \pm 11**
Adrenales	69 \pm 14	55 \pm 28	64 \pm 8	63 \pm 3	61 \pm 16	46 \pm 5

*Los valores de los pesos se expresan en mg. Se representan medias \pm sd de 9 a 11 animales en los grupos sedentarios y 5 animales en los entrenados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ tratados vs sin tratar; • $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ entrenados vs sin entrenar.*

TABLA 3. Modificaciones en el peso de los órganos linfáticos timo y bazo y de las cápsulas adrenales observados en ratas Wistar macho tras la administración de 2 mg/kg/día del agonista β 2-adrenérgico clenbuterol (CL), en dos aplicaciones durante 14 días consecutivos, en animales sedentarios o que participan en un programa de entrenamiento en tapiz rodante de 13 semanas de duración, al iniciar el entrenamiento (E2) o en las dos últimas semanas del mismo.

tos es muy superior, en ambos casos, a la de los efectos de los diferentes tipos de actividad física que se han analizado, que llevan a una reducción del peso del timo del 50-60% (tabla 3 en este trabajo y 17). La sensibilidad de este órgano linfático a ambos tipos de anabolizantes, debe tener su explicación en la existencia de receptores en las células inmunitarias, particularmente los linfocitos, que reconocen a estos productos activos o a otros mensajeros inducidos por ellos en el organismo o que derivan de ellos. Los linfocitos parecen presentar receptores de hormonas esteroídicas que podrían justificar el efecto de los andrógenos (18), así como receptores adrenérgicos, cuya densidad puede regularse por las catecolaminas (19), que podrían justificar los cambios en la distribución de linfocitos (20), las modificaciones de la respuesta inmune por el ejercicio (21, 22), y los efectos de agonistas β -adrenérgicos sobre órganos linfáticos, como el que aquí se describe. Sin embargo, no resulta evidente la forma en que la activación de los receptores adrenérgicos por el clenbuterol y de los receptores esteroídicos por los esteroides anabólicos androgénicos, puede conducir a una respuesta común que comienza con una disminución drástica del peso del timo. Por la importancia que el sistema inmune tiene en la situación general del individuo y, por lo tanto, en su respuesta al entrenamiento, y viceversa, el análisis de la interacción de factores hormonales con el sistema inmune constituye un aspecto de indudable interés en el que merece la pena profundizar.

CONCLUSIONES FINALES

El estudio de los efectos de un tratamiento de 14 días consecutivos con el agonista β 2-adrenérgico clenbuterol sobre el desarrollo corporal y el peso de diferentes órganos, en ratas Wistar macho sedentarias o ejercitadas en tapiz rodante en dos situaciones diferentes de acondicionamiento físico previo e intensidad de entrenamiento, ha puesto de manifiesto que el clenbuterol es un agente anaboli-

zante muy efectivo para los músculos esqueléticos formados preferentemente por fibras rápidas, siendo su efectividad mucho más reducida para músculos en los que la proporción de fibras de contracción lenta es elevada, como el músculo sóleo. Sin embargo, los efectos miotróficos del entrenamiento en tapiz rodante afectaron al músculo sóleo de manera más acusada que a los músculos formados por fibras rápidas. La conclusión práctica de este hecho es que la ejecución de una actividad física programada en presencia de clenbuterol, conduce a la hipertrofia tanto los músculos formados por fibras rápidas (debido al tratamiento) como los formados por fibras lentas que participan en la actividad física (fundamentalmente por el ejercicio). El miocardio respondió al tratamiento con clenbuterol de forma muy parecida al músculo sóleo, observándose un efecto del tratamiento en los animales sedentarios que desaparece al irse haciendo aparentes los efectos del entrenamiento. Así pues, el efecto miotrófico del clenbuterol difiere del observado con los anabolizantes esteroídicos en que el agonista β_2 -adrenérgico es capaz de inducirlo en animales sedentarios y, dependiendo del tipo de fibras, también en los entrenados. Ambos grupos de anabolizantes coinciden, sin embargo, en reducir muy significativamente el peso del timo, aunque el clenbuterol no mostró ningún efecto sobre el peso del bazo ni de las adrenales, que también se vieron afectadas por los anabolizantes esteroídicos. De todos estos datos se concluye que el clenbuterol puede inducir un efecto miotrófico elevado en tan solo 2 semanas de tratamiento, que no es aditivo a los efectos del ejercicio pero que se complementa con éste en el entrenamiento en tapiz rodante por ser su eficacia mayor sobre las fibras menos sensibles al entrenamiento. Con la excepción de lo indicado para el timo, no se han observado otros efectos tróficos sobre órganos formados por tejidos no musculares. Como se indicaba en el trabajo precedente para los esteroides anabólico-androgénicos, se hace preciso el desarrollo de análisis bioquímicos detallados para excluir la existencia de efectos sobre otros órganos que no podrían ponerse de manifiesto por una observación puramente morfológica, así como para entender las respuestas mediadas por estos receptores en el contexto de los procesos de adaptación al entrenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a M. Pérez Martínez por su colaboración en la aplicación de los programas de entrenamiento, a Mercedes Casanova por su ayuda técnica y a Javier Palacín y John Sparrowe por su colaboración en el cuidado y tratamiento de los animales de experimentación. La realización de este trabajo ha sido posible gracias a ayudas del Consejo Superior de Deportes y de la CICYT (Dep 91-0206). El Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" recibe una ayuda institucional de la fundación Ramón Areces.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sahlin, K. y A. Katz. Adenine nucleotide metabolism. En: Poortmans, J.R. (ed). Principles of Exercise Biochemistry. Med. Sport. Sci. 38:137-157, 1993.
2. Shimazu, T. The hypothalamus and neural feed-forward regulation of exercise metabolism. En: Integration of Medical and Sport Sciences. Med. Sport. Sci. 37:20-32, 1992.

3. Cooper, J.R., F. E. Bloom y R. H. Roth. The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press, New York, 1991.
4. Nogrady, T. Medical chemistry: a biochemical approach (2nd ed.). Oxford University Press, New York, 1988.
5. Emorine, L.J., S. Marullo, M. M. Briend-Sutren, G. Patey, K. Tate, C. Delavier-Klutchko y A. D. Strosberg. Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 245:1118-1121, 1989.
6. Reddy, N. B. y W. K. Engel. *In vitro* characterization of skeletal muscle β -adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase. *Biochim. Biophys. Acta* 585:343-359, 1979.
7. Vallieres, J., C. Cote y L. Bukowiecki. Regulation of β -adrenergic receptors in rat skeletal muscles by catecholamines *in vivo*. *General Pharmacol.* 10:63-67, 1979.
8. Williams, R.S. Adrenergic receptors in skeletal muscle. En: Knuttgen, H. G., (ed.), *Biochemistry of exercise VI. Human Kinetics Pub.*, Champaign, Illinois, p. 77-86, 1985.
9. Manso, R. Efectos fisiológicos y mecanismo de acción de las sustancias y métodos de dopaje. En: González-Gallego, J. (ed) *Fisiología de la Actividad Física y del Deporte*. Interamericana-McGraw-Hill. 1992, p.303-335.
10. Emery, P. W., N. J. Rothwell, M. J. Stock, y P. D. Winter. Chronic effects of β_2 -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci. Rep.* 4:83-91, 1983
11. Yang, Y. T. y McElligot, M.A. Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem. J.* 261:1-10, 1989.
12. Reeds, P. J., S. M. Hay, P.M. Dorward, y R. M. Palmer. Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle protein synthesis. *Br. J. Nutr.* 56:241-258, 1986.
13. Maltin, C. A., M. I. Delday, y P.J. Reeds. The effect of a growth promoting drug, clenbuterol, on fibre frequency and area in hind limb muscles of young male rats. *Biosci. Rep.* 6:293-299, 1986.
14. Maltin, C. A., M. I. Delday, S. M. Hay, F. G. Smith, G. E. Loble, y P.J. Reeds. Clenbuterol, a beta-agonist, induces growth in innervated and denervated rat soleus muscle via apparently different mechanisms. *Biosci. Rep.* 7:425-432, 1987.
15. Schiavetta, A.M., M. f. Miller, D. K. Lunt, S.K. Davis y S. B. Smith. *J. Anim. Sci.* 68:3614-3619, 1990.
16. Martínez, J.A., M.P. Portillo y J. Larralde. Anabolic actions of a mixed β -adrenergic agonist on nitrogen retention and protein turnover. *Horm. Metab. Res.* 23:590-593, 1991.

17. Fernández, E., R. Hernando, E. Díaz y R. Manso. Efectos tróficos e interacción con el entrenamiento de agonistas hormonales anabolizantes: I. Esteroides anabólico-androgénicos. *Investigación y Ciencias del Deporte*, 2, 7-31, 1995.
18. Paavonen, T. Hormonal regulation of immune responses. *Ann. Med.* 26, 255-258, 1994.
19. Van Tits, L.J., M.C. Michel, H. Grosse-Wilde, y M.Happel. "Catecholamines increase lymphocyte β_2 -adrenergic receptors via a β -adrenergic, spleen-dependent process". *Am. J. Physiol.* 258: E191-202, 1990.
20. Crary, B., S.L. Hauser, M. Borysenko, I. Kutz, C.Hoban, K.A. Ault, H.L. Weiner y H. Benson. "Epinephrine-induced changes in the distribution of lymphocytes subset in peripheral blood of humans". *J.Immunol*,131: 1178-1181, 1983.
21. Christensen, N. J. y H. Galbo. Sympathetic nervous activity during exercise. *Annu. Rev. Physiol.* 45: 139-153, 1983.
22. Kappel, M., N. Tvede, H. Galbo, P.M. Maahr, M. Kjaer, M. Linstow, K. Klarlund y B.K. Pedersen. "Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine". *J. Appl. Physiol.*, 70(6):2530-2534, 1991.



**ESTADO INMUNOLÓGICO
DE DEPORTISTAS
DE ALTA COMPETICIÓN**

*Ferrández Ortiz, M^a D.
Fuente del Rey, M. de la*



M.^a Dolores Ferrández Ortiz, es Licenciada en CC. Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid en la especialidad Bioquímica y Biología Molecular. Doctora en Ciencias Químicas por la U.A.M. Ha colaborado en la actividad académica del Departamento de Biología animal II (Fisiología animal) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.



Mónica de la Fuente del Rey, Licenciada en Ciencias Biológicas y en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid. Doctora en Ciencias Biológicas por la U.C.M. es catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Biología Animal II (Fisiología animal) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.C.M.

Resumen: El objetivo principal del presente trabajo ha sido estudiar el estado inmunológico de una serie de deportistas de alta competición o de "élite" (piragüistas, judocas, atletas, ciclistas y jugadores de baloncesto) en situación de descanso dentro de unos programas de entrenamiento concretos, en comparación con el estado inmunológico de individuos que realizan ejercicio de forma regular y moderada (estudiantes del INEF) y con el de personas sedentarias sanas de edades semejantes (controles). Para ello, se extrajeron muestras de sangre en las que, una vez separadas las poblaciones de linfocitos y de polimorfonucleares neutrófilos se valoraron en las mismas, sus funciones más características. Así en los linfocitos se estudió la capacidad de respuesta proliferativa a mitógenos mediante el test de transformación linfoblástica. En neutrófilos se valoró algunas de las etapas más típicas del proceso fagocítico, como la adherencia a endotelio vascular, la movilidad dirigida o quimiotaxis, la capacidad de ingestión de partículas extrañas, y la capacidad de destrucción del material fagocitado mediante la producción de radicales libres de oxígeno, concretamente el ión superóxido.

Además se valoraron los niveles plasmáticos de algunas de las "hormonas del estrés" como cortisol, ACTH y β -endorfina.

Por último, se midieron los niveles de defensas antioxidantes vitamínicas (vitaminas C y E, mediante HPLC) y enzimáticas (SOD) así como un indicador de la peroxidación lipídica (MDA) en las células indicadas.

En uno de los deportes, ciclismo, tuvimos la oportunidad de disponer de muestras de sangre en dos ocasiones, de forma que pudimos valorar el efecto de un aumento en la intensidad del entrenamiento sobre los parámetros mencionados anteriormente.

Los resultados sugieren que, en general, los deportistas de élite estudiados presentan una cierta inmunodepresión asociada, sobre todo, a los linfocitos, aunque también a algunas actividades de los neutrófilos, mientras que el ejercicio realizado de forma regular y moderada induce una estimulación de la respuesta inmune.

Palabras clave: alta competición, ejercicio físico, entrenamiento, linfocito, neutrófilo, linfoproliferación, función fagocítica, estrés, antioxidantes.

1. INTRODUCCION

1.1. ESTRES, EJERCICIO FISICO Y SISTEMA INMUNE. INTERACCION NEUROINMUNOENDOCRINA

El Sistema Inmune (SI), el encargado del reconocimiento de lo propio frente a lo extraño y de la destrucción de esto último, representa el sistema de defensa del organismo animal y está constituido por gran variedad de células, cada una de las cuales con una función determinada pero que actúan estrechamente relacionadas entre sí.

A partir de estudios realizados tanto en humanos como con distintos modelos de animales de experimentación, se ha observado que la influencia del ejercicio físico sobre el SI puede estar condicionada por el tipo, la intensidad y duración del mismo, así como por la forma física de quien lo realiza (sedentario, entrenados, atletas de alta competición, etc.) y en que condiciones (características ambientales, presiones debidas a la alta competición, etc) se lleva a cabo.

En general, desde hace tiempo y en la actualidad, existe la creencia de que la realización de actividades físicas es beneficioso para la salud mientras que un estado sedentario, es perjudicial. Desde el punto de vista del SI se podrían hacer diferentes matizaciones en relación a esa creencia popular ya que hay bastantes evidencias sobre el hecho de que ejercicios intensos y de larga duración, deportes duros, sesiones prolongadas de entrenamiento, competiciones, etc., son perjudiciales para dicho SI (1,2). En este sentido parece que el SI ha de responder ante la situación de estrés fisiológico y psicológico que significa el entrenamiento y la competición, de manera proporcional a la duración e intensidad de los mismos (1,3), y lo que ocurre es que se produce una importante inmunodeficiencia que hace a los deportistas mucho más susceptibles a infecciones y que puede aumentar, además, la severidad de ciertas enfermedades (2,4).

Por otro lado, aunque no hay demasiados estudios sobre los efectos del ejercicio moderado, estos podrían aumentar la competencia inmune y o bien no modificarla o producir efectos beneficiosos para la misma y por tanto, para la salud (5,6).

En cuanto a los trabajos existentes sobre la relación entre ejercicio físico y SI, la mayoría hace referencia únicamente a los cambios cuantitativos que sufren las células inmunocompetentes como consecuencia de dicho ejercicio y, aún así, no hay un acuerdo generalizado al respecto. Dependiendo del tipo, intensidad y duración del ejercicio, del estado de entrenamiento de los individuos, y del momento en el que se extraen las muestras para llevar a cabo la cuantificación, se han descrito todos los posibles resultados, bien sean aumentos, descensos e incluso ausencia de cambios en el número de las diferentes poblaciones y subpoblaciones celulares. Muchos de estos trabajos han sido relacionados en diversas revisiones y en trabajos como los de Simon (7), Nieman y cols. (8), Tharp y Preuss (9), Barriga y cols.(10), entre otros. A pesar del desacuerdo hay cierta tendencia a mostrar que los niveles de linfocitos y granulocitos circulantes aumentan rápidamente con el ejercicio físico (6,11,12,13).

En lo referente a los estudios sobre el efecto del ejercicio físico en la funcionalidad de las células inmunes, estos son más escasos, puntuales y únicamente se han empezado a llevar a cabo en los últimos años.

Cuando hablamos de la **función** de los **linfocitos**, son muchos los autores que sugieren que puede encontrarse temporalmente disminuida. La valoración de la función linfocítica con el ejercicio se estudia habitualmente mediante ensayos que analizan la capacidad proliferativa de estas células en respuesta a antígenos o mitógenos específicos. Las valoraciones se efectúan a través del test de transformación linfoblástica, detectándose la síntesis de ADN, la transformación blástica y la proliferación de los linfocitos.

La mayoría de las investigaciones relacionadas con este punto indican que, inmediatamente después de realizar un ejercicio, la transformación linfoblástica analizada "ex vivo" en respuesta a mitógenos disminuye, tanto en humanos como en animales de experimentación(1,8,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26). Sin embargo, también hay algunos autores que encuentran que esta función está aumentada (6,27,28).

En cuanto al efecto del ejercicio sobre la capacidad de síntesis de inmunoglobulinas de los linfocitos B y las células plasmáticas subsecuentes a su activación, en general, parece que no se producen diferencias en dicha capacidad de síntesis con el ejercicio en relación a la presente en los individuos sedentarios(17,29). No obstante, algunos autores como Pedersen (6) , Verde y cols. (19), Mackinnon y Jenkins (30) y Mackinnon y cols. (31) sugieren que el ejercicio induce una disminución de IgG, IgA e IgM.

En relación a la **funcionalidad** de las **células fagocíticas**, aspecto de la respuesta inmune poco estudiado en general y en particular en las variaciones con el ejercicio físico, los resultados obtenidos son también bastante contradictorios. Este hecho se debe en parte, a la metodología utilizada para el análisis de las distintas actividades de estas células, además de las debidas a las diferencias en los protocolos de ejercicio y los individuos estudiados, como ya se ha comentado.

Las células fagocíticas (principalmente PMNs neutrófilos y monocitos en sangre circulante y macrófagos en diferentes localizaciones tisulares) tienen como función más representativa la actividad que les da el nombre: la fagocitosis, la cual engloba un complejo proceso consistente en varias etapas más o menos consecutivas en el tiempo. Estas etapas secuenciales son: adherencia al endotelio vascular o a los tejidos; quimiotaxis o movimiento del fagocito hacia el foco de infección inducido por un gradiente de quimioatrayente; unión e ingestión del material extraño y finalmente, destrucción del mismo en el interior del fagocito.

Los resultados obtenidos por los diferentes investigadores muestran, en general, una estimulación de esa actividad fagocítica aunque la estudié en distintos protocolos de ejercicio (sedentarios sometidos a ejercicio extenuantes, entrenados, deportistas, etc.). Esta estimulación se ha detectado tanto en humanos como en animales de experimentación (12,32,33,34,35,36,37,38,39,40).

Los **mecanismos** por los que se producen estas variaciones de la función inmune con el ejercicio y la actividad física no están claros, pero se sabe que intervienen gran cantidad de hormonas, citocinas y factores que se liberan durante la realización física. Entre ellos se pueden destacar los corticosteroides (cortisol o corticosterona) (41,42,43,44), catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) (43,44), β -endorfina (45,46,47), interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-6) (13,33,34,48,49,50) e interferón (49).

Para poder explicar estos mecanismos es necesario tener en cuenta el papel que sobre el SI juega el estrés inducido por dicha actividad física. Además no se trata solo de un estrés fisiológico y bioquímico, sino también un estrés psicológico (51), que puede producirse cuando el ejercicio se realiza de forma profesional y se trata de deportes de alta competición. Debemos tener presente que el ejercicio físico constituye un modelo de estrés clásicamente establecido (52), y por tanto su realización promueve una serie de modificaciones transitorias en los diferentes sistemas de regulación: el sistema nervioso (SN), el sistema endocrino (SE) y el SI que conjuntamente juegan un importante papel en la adaptación biológica, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis animal. En el caso de una práctica deportiva regular y de cierta intensidad, estos sistemas pueden dar paso a mecanismos adaptativos de carácter más o menos permanente.

Además, aunque durante mucho tiempo se ha pensado que el SI funcionaba de forma autónoma hoy se sabe que actúa en total comunicación con los sistemas reguladores clásicos: el SN y el SE.

Los primeros abordajes sobre la relación del SI y el SN se remontan a los estudios de Sir Thomas Lewis (53) y a los trabajos de Selye sobre SI y estrés cuando, en 1936 (54), describió el "Síndrome General de Adaptación". Según Selye, este síndrome abarcaba el conjunto de cambios orgánicos que entran en juego como respuesta del organismo a toda una serie de estímulos nocivos (estresantes) y que incluyen aumento del tamaño adrenal, involución del timo, disminución de la masa de los órganos linfoides y úlceras gastrointestinales. La palabra "estrés" la introdujo el propio Selye para indicar esa respuesta del organismo en una determinada situación que tienden a alterar el equilibrio fisiológico normal u homeostasis, mientras que el término "estresante" hacía referencia al estímulo o agente nocivo (55). La primera demostración de la existencia evidente de esa relación entre el SN y el SI se debe a Besedovsky y cols. (56) al observar el efecto inmunosupresor del cortisol.

En los últimos años se ha comprobado a través de toda una serie de trabajos que tal comunicación entre los sistemas reguladores es bidireccional y que tienen receptores y mediadores comunes (57,58,59). Esto ha llevado a plantear el SI como órgano sensorial para estímulos de tipo no cognocitivo como virus, bacterias, etc., en estrecha interconexión con el SN, órgano receptor de estímulos cognocitivos de tipo lumínico, químico y por supuesto de situaciones de estrés. En este sentido, no solo las influencias neuroendocrinas modifican el SI, sino que también el SI media una gran variedad de efectos psicofisiológicos.

Puesto que los órganos linfoides primarios (timo, médula ósea) y los secundarios (bazo, nódulos linfáticos y tejidos linfáticos asociados al intestino) están ricamente inervados e irrigados, es posible la llegada de mediadores nerviosos y endocrinos a las células inmunocompetentes (60), las cuales tienen receptores para numerosos neurotransmisores y hormonas, que pueden llevar a cabo efectos inmunomoduladores que para muchos de esos mediadores ya han sido demostrados. Además, moléculas como la adrenocorticotropa (ACTH), endorfinas, TSH, GH, VIP, PRL, somatostatina, FSH y LH no sólo ejercen numerosos efectos inmunorreguladores si no que pueden ser producidas por los leucocitos. De hecho las células inmunes no sólo poseen receptores para esos neuropéptidos si no también para los factores que inducen la expresión en el Sistema Neuroendocrino

(SNE) de muchos de ellos, como el CRF, GHRH o TRH (58,61,62). Pero también los efectos que producen estos mediadores nerviosos y endocrinos en el SI pueden repercutir a su vez en el SN y SE ya que citocinas producidas por células inmunes son moléculas señal ("inmunotransmisores") que pueden actuar sobre el SNE y concretamente en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) en el cual se presentan receptores para las mismas (63).

En base a todas estas evidencias y a otras hechas, como la presencia de factores embriológicos, estructurales, de conducta, clínicos y farmacológicos que muestran una interacción entre los sistemas nerviosos e inmune y la existencia de analogías estructurales entre los antígenos de membrana de las células del SI y SE, Homo-Delarche y Dardenne (64) argumentaron la realidad de una red inmuno-neuroendocrina en el organismo animal.

Aún así, todavía no se pueden especificar los mecanismos bajo los que se produce la relación funcional entre el SN y el SI, así como tampoco, el significado funcional de las conexiones neuroanatómica, neuroquímica y neuroendocrinas entre el cerebro y el SI (65).

Una consecuencia directa de la interacción entre los Sistemas Neuroendocrino e Inmune es la aumentada sensibilidad de la respuesta inmune al estrés (66).

Clásicamente los sistemas encargados de mediar las respuestas fisiológicas al estrés son: a) el sistema adrenocortical, concretamente en su capacidad de secretar glucocorticoides y b) el sistema simpatoadrenal, con su secreción de catecolaminas. Por tanto, en este contexto de la interacción neuroinmunoendocrina (NIE) es interesante repasar brevemente el efecto de esas sustancias (glucocorticoides y catecolaminas) sobre algunos parámetros de la inmunidad.

La respuesta adrenocortical al estrés, responsable de la secreción de **glucocorticoides**, está mediada via SNC. El estímulo de estrés causa alteraciones bioquímicas en células del hipotálamo que dan lugar a la secreción de CRF, el cual induce la secreción de ACTH en la pituitaria. Esta hormona incide en las células de la corteza suprarrenal, liberándose los glucocorticoides. Los glucocorticoides circulantes (corticosterona o cortisol) modulan muchas funciones en el organismo como la utilización de la energía, tono cardíaco, inhibición de ciertas funciones del SI así como ejercen una regulación, basada en el establecimiento de un "feedback" negativo, sobre las células neurosecretoras hipotalámicas y las células corticotropas de la pituitaria en el eje HPA. .

El efecto inmunosupresor de los glucocorticoides es una de las consecuencias finales del "loop" regulatorio que se establece en respuesta al estrés (67,68,69,70,71). Según estos últimos autores, los corticosteroides modifican la intensidad del SI mediante mecanismos altamente específicos a múltiples niveles, incluyendo la expresión genética, transcripción, transducción, procesamiento post-transduccional y secreción de proteínas; también a nivel de proliferación y diferenciación de células progenitoras. El efecto de los glucocorticoides sobre las células diana depende de la concentración, duración de la exposición y tipo de glucocorticoide. Los efectos también varían dependiendo del subtipo de receptor al cual se une el esteroide, del estado de diferenciación de la célula diana, y del periodo de exposición de los glucocorticoides en relación a la exposición a estímulos antigénicos o mitogénicos.

En humanos, los glucocorticoides inhiben la acumulación de eosinófilos, macrófagos y neutrófilos en los sitios de inflamación, incrementan el número de neutrófilos circulantes, pero reducen el número de linfocitos, monocitos y eosinófilos. La linfopenia observada parece ser debida a una selectiva redistribución de los linfocitos y a procesos de linfólisis. De hecho también afectan a la linfopoyesis tímica (67,72).

A nivel celular, inhiben las funciones de las células inflamatorias (72,73) y afectan a las interacciones de esas células en los sitios de inflamación (74). Los glucocorticoides inhiben la cascada de la respuesta inmune, virtualmente a todos los niveles, incluyendo la presentación antigénica del macrófago al linfocito (75), proliferación linfocítica y diferenciación de linfocitos a células efectoras: linfocitos colaboradores y citotóxicos, células NK y células B formadoras de anticuerpos. Los glucocorticoides disminuyen la inmunidad antitumoral producida vía monocito-macrófago (76,77). Estos últimos autores proponen como vía de disminución de la actividad inmune en monocitos y macrófagos, la inhibición del metabolismo del ácido araquidónico en estas células. En leucocitos, en general, y en otros tipos de células, estas hormonas promueven la síntesis de lipocortina 1, la cual regula negativamente la actividad de linfocitos, polimorfonucleares (PMNs), monocitos y macrófagos (78).

Ciertos parámetros de la inmunidad pueden estar influenciados por otros mediadores neuroendocrinos del estrés, tales como las **catecolaminas y opiáceos endógenos**, via receptores específicos que están presentes en los linfocitos y macrófagos. Estos mediadores influyen en el SI. Así, ciertas funciones de los linfocitos T y B y de las células NK pueden ser inhibidos o estimulados por hormonas del estrés como las **β -endorfinas y met-enkefalinas** (66).

Las **catecolaminas** pueden reducir el "pool" de linfocitos circulantes y la respuesta proliferativa a mitógenos de dichos linfocitos, pueden bloquear la actividad citolítica de los macrófagos, y aumentar o suprimir la respuesta primaria de los anticuerpos (66).

A nivel del SI, el mediador más importante en la respuesta inmune al estrés es una citocina, la **IL-1**, también fundamental en los procesos de infección y respuesta antigénica que no solo estimula el eje HPA, sino que además produce una gran variedad de efectos en el cerebro (79,80,81).

Por tanto, la respuesta neuroinmunoendocrina al estrés nos da un ejemplo de como los tres sistemas pueden responder a un estímulo fisiológico como algo integrado. La hormona liberadora de corticotropina, **CRH**, y la **IL-1**, son los dos principales componentes implicados en la regulación al estrés por este circuito, encontrándose receptores de membrana para ellos en pituitaria, cerebro y bazo (82,83,84).

1.2. EJERCICIO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

Los radicales libres de oxígeno, productos del metabolismo del oxígeno, pueden intervenir en muchos procesos patológicos y de daño en general. Así es bien conocida su participación en el proceso de envejecimiento y, por tanto, los antio-

oxidantes, compuestos capaces de neutralizar dichos radicales libres, pueden ser importantes a la hora de evitar o retrasar tales daños.

Se cree que la práctica habitual de un ejercicio o deporte de tipo aerobio a nivel profesional, acelera el proceso normal de envejecimiento reduciendo la longevidad (85,86,87,88). El papel del ejercicio en la producción y eliminación de los radicales libres no está claro. Aún así, hay evidencias recientes que sugieren que el elevado consumo de oxígeno puede aumentar la actividad de los radicales libres y la peroxidación lipídica (89,90,91,92,93), incrementando el daño a los tejidos (94). Lo que sí parece claro es que el tipo, duración e intensidad del ejercicio, así como el estatus de entrenamiento, afectan a la actividad de los radicales libres. Estas mismas evidencias indican que el estrés oxidativo asociado a la actividad de los radicales libres inducida por ejercicio parece que es más tolerado por los individuos entrenados en ejercicios de intensidad moderada (93), que cuando se trata de un ejercicio extenuante (90,95).

Se sabe que un elaborado sistema de defensa antioxidante provee de varios grados de protección celular contra los radicales libres en todas las especies. Dichos sistemas de defensa antioxidante incluyen compuestos químicos capaces de "eliminar" las especies reactivas de oxígeno (vitaminas E y C, β -caroteno, glutatión y otros compuestos tiólicos) así como una serie de enzimas especializadas en la reducción de los radicales libres a especies más estables. Las tres enzimas más importantes son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Otras enzimas tales como la glutatión reductasa (GR), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y glutatión S-transferasa (GST) apoyan a las enzimas antioxidantes primarias suministrando substratos o reduciendo equivalentes (96).

A pesar de los cambios producidos por los radicales libres inducidos por el ejercicio, hay un lado positivo en este estrés oxidativo asociado al ejercicio regular y es que se ha descrito que determinados componentes de este sistema de defensa antioxidante aumentan en tejidos entrenados después de ejercicios regulares (92,93,96,97,98,99).

A continuación repasaremos brevemente la influencia de los antioxidantes vitamínicos sobre el SI, ya que parece que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y en la funcionalidad de dicho sistema.

1.2.1. Antioxidantes vitamínicos y SI

Las células inmunes, a través de la generación de radicales libres de oxígeno, llevan a cabo importantes funciones, como la activación de leucocitos (100), los procesos de inflamación (101), la actividad de destrucción de células extrañas a través del proceso citotóxico, etc. Pero estos radicales de oxígeno que permiten esas funciones tienen que ser eliminados por los antioxidantes celulares para evitar sus efectos dañinos en las propias células inmunes.

Vit. E: ó tocoferol es el antioxidante liposoluble más importante en las células (102). Según ciertos autores (103,104), la deficiencia de dicha vitamina provoca una serie de cambios funcionales en el SI como la disminución de la capacidad

quimiotáctica y de ingestión de partículas por los PMNs neutrófilos. Además, dicha deficiencia también produce pérdida en la capacidad de unión y digestión de bacterias (105), así como en la actividad enzimática antioxidante de los fagocitos (106) y en la respuesta proliferativa de los linfocitos (107). Por el contrario, la suplementación con vitamina E aumenta el número de células inmunes en determinadas localizaciones como sucede con los macrófagos alveolares así como estimula la actividad fagocítica de los mismos (108), y la respuesta proliferativa de los linfocitos (109). En recientes estudios con animales de experimentación también se ha visto que la vitamina E aumenta la respuesta de ciertos anticuerpos a determinados antígenos, que mejora la resistencia a la infección y que incrementa la inmunidad humoral y celular (109,110,111). Por tanto, las evidencias experimentales apuntan a que la suplementación con vitamina E estimula la respuesta inmune (112). Las células fagocíticas toman la vitamina E del medio extracelular siendo capaces de concentrar grandes cantidades que provocan la inhibición de la fosfolipasa A2 y la ciclooxigenasa en dichas células (113). Por este motivo, la estimulación inmune producida por la vitamina E parece unida a la normalización de la membrana lipídica en linfocitos (114).

Vit C: o ácido ascórbico, también juega un importante papel en la función de las células inmunes, tanto fagocitos (115,116) como en linfocitos (117,118). Además, la evaluación del contenido de ácido ascórbico en los leucocitos ha sido considerado como el índice más real del estado nutricional de los tejidos en humanos, más que el contenido plasmático (119,120).

Los linfocitos muestran una elevada capacidad de concentración de ácido ascórbico, mayor que granulocitos y plaquetas (121). Esta alta concentración de vit C sugiere que debe tener un importante papel en la función fisiológica de estas células. De hecho se ha visto que el ácido ascórbico aumenta la respuesta linfoproliferativa al mitógeno PHA, tanto in vivo (122) como in vitro (117). Además, la deprivación de ácido ascórbico conlleva una severa deficiencia funcional en las células T que puede ser corregida con suplementación (123).

Los neutrófilos también son capaces de acumular grandes cantidades de vit. C cuando hay concentraciones fisiológicas en el medio extracelular, aunque su papel bioquímico no está claro (124). Se sabe que el ácido ascórbico es consumido rápidamente durante la activación de los neutrófilos, previniendo la peroxidación lipídica y una vez que se ha consumido toda la vitamina C aparecen hidroperóxidos de fosfolípidos plasmáticos, ésteres de colesterol y triglicéridos (100). Frei y Ames (125) demostraron que el ácido ascórbico es el único antioxidante endógeno en plasma que puede proteger a los lípidos del daño peroxidativo de muchos tipos de estrés, siendo mucho más efectivo en este aspecto que el ácido úrico, β -carotenos, tocoferol, etc., los cuales disminuyen la tasa de peroxidación lipídica pero que son incapaces de prevenir la iniciación.

En cuanto a la distribución y la función de la vit C en los neutrófilos se ha visto que en el interior de la célula se encuentra solo la forma reducida y que no está unida a proteína, lo que sugiere que puede funcionar como un antioxidante protector que reduce los oxidantes que entran en el citosol desde el fagosoma. De hecho, se ha encontrado que durante el proceso fagocítico de neutrófilos y macrófagos hay una disminución del ácido ascórbico (115,116). También es posible que cierta

cantidad de vitamina C citosólica sea secretada hacia el exterior de la célula con el fin de reducir oxidantes cercanos a la superficie celular. Por ello, tanto el ácido ascórbico intracelular como extracelular podrían estar implicados en la protección fisiológica frente al daño de los radicales libres en los procesos de inflamación (126), preservando las células fagocíticas y protegiendo los tejidos frente a los compuestos químicos bactericidas producidos por los fagocitos durante el estallido respiratorio.

Por último, como fue propuesto por Tappel (127) y más tarde revisado por Bendich (104), la vitamina C está implicada probablemente en la regeneración de la forma reducida de la vitamina E desde el radical tocoferoxil, aunque sobre este punto los resultados son contradictorios (102). Según Bendich (104), ambas vitaminas actuarían sinérgicamente protegiendo las membranas frente a la peroxidación lipídica y protegiendo a los neutrófilos del daño de los radicales producidos por ellos mismos.

1.2.2. Antioxidantes enzimáticos y SI

Además de los sistemas de defensa antioxidante vitamínicos o no enzimáticos, existe otro tipo de sistemas antioxidantes enzimáticos. Pertenecen a este grupo enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa (CAT), encargadas de eliminar los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno respectivamente y la glutatión peroxidasa (GPx), que contribuye también a eliminar el peróxido de hidrógeno. La relación de este sistema antioxidante y el SI es bastante desconocida, aunque evidentemente los niveles de estas enzimas en las células inmuno-competentes son importantes. La función fisiológica de la SOD está en relación con la toxicidad de su sustrato. La ausencia de esta actividad enzimática implica un aumento de los niveles de radicales superóxido, con los consiguientes perjuicios para las células. Entre estos perjuicios podemos destacar la peroxidación lipídica que sufren las membranas biológicas, dando lugar a una serie de productos de peroxidación como el malondialdehído (MDA).

1.2.3. Ejercicio, Sistema Inmune y Antioxidantes

La mayoría de las investigaciones realizadas en relación a este punto se han referido al efecto de las suplementaciones vitamínicas en individuos que realizan ejercicio físico (33,34), pero hay pocas evidencias de cómo reaccionan los niveles intracelulares de antioxidantes de las células inmunes de individuos que realizan ejercicio físico. En algunos trabajos sobre este tema se ha visto que un ejercicio moderado estimula la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales y que esta, va acompañada de un aumento de los niveles intracelulares de ácido ascórbico, tanto en ratón (128), como en cobaya (37). Además, en linfocitos se ha visto que cuando el ejercicio moderado induce una estimulación de la función linfoproliferativa, esto va acompañado de una importante disminución de los niveles intracelulares de ácido ascórbico (118).

La suplementación con vit E y C se ha visto que estimula la respuesta inmune, tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que este hecho puede ser importante en estados de inmunosupresión tales como la vejez y el ejercicio físico extenuante

(112,117,129) ya que podrían retardar algunos de los cambios que se producen en el SI con la vejez y el subsecuente desarrollo de enfermedades asociadas (112).

Por tanto, y después de introducir el tema objeto de este trabajo, los **objetivos** que nos planteamos se pueden enumerar de la siguiente manera:

1.- Estudiar la funcionalidad de los dos tipos principales de células inmunes que se encuentran presentes en sangre periférica: los linfocitos y polimorfonucleares neutrófilos en deportistas y en individuos que realizan un ejercicio moderado de forma habitual (estudiantes de INEF) y compararla con la que muestran las células de individuos de vida sedentaria (controles).

Las funciones a estudiar serán las más representativas de ambos tipos celulares: la capacidad proliferativa frente a mitógeno que tienen los linfocitos (semejante a la respuesta "in vivo" frente a antígeno) y las diferentes etapas del proceso fagocítico que llevan a cabo los neutrófilos, principales fagocitos de sangre circulante.

2.- Valorar los niveles plasmáticos de cortisol, ACTH y β -endorfina como indicadores de la situación de estrés.

3.- Analizar los niveles de defensas antioxidantes vitamínicos (C y E) y enzimáticos (SOD) así como un indicador de la peroxidación lipídica (MDA) en esas células.

4.- En ciclistas, comparación de todos los parámetros indicados en dos momentos de su programa de preparación, de cuatro años de duración: en el segundo año y justo antes de su participación en los Juegos Olímpicos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Grupos experimentales

A. Individuos varones, sanos y jóvenes (25 ± 3 años de edad), de vida sedentaria (hacia varios años que no realizaban ningún tipo de actividad física) que constituyeron el grupo control. A cada uno de los individuos de este grupo se les extrajeron 15 ml de sangre de la vena antecubital a primera hora de la mañana.

B. Individuos varones, sanos y jóvenes (18 ± 2 años de edad) y que en este trabajo hemos denominado grupo de "Entrenamiento Moderado" puesto que eran alumnos de primero del I.N.E.F (Instituto Nacional de Educación Física), por lo que habitualmente realizaban ejercicio físico (como mínimo el correspondiente a sus asignaturas de deporte). Para tratar de unificar a los individuos de este grupo seleccionamos aquellos que solo realizaban las actividades físicas propias de su carrera, es decir, alrededor de 15 horas semanales de deporte de gran variedad. Las muestras de sangre fueron cedidas por el Centro Nacional de Investigación y Ciencias del Deporte (ICd) del Consejo Superior de Deportes (C.S.D.)

C. Por último, este grupo está constituido por individuos varones sanos y jóvenes (entre 22 y 28 años) "Deportistas de Alta Competición ó de Elite" pertenecientes a varias selecciones nacionales: Piragüismo, Judo, Atletismo (fondo y medio fondo),

Ciclismo (pista) y Baloncesto. Las muestras de sangre de estos individuos fueron cedidas, de nuevo, por el ICd. Todas las selecciones estaban dentro del plan de preparación para los Juegos Olímpicos de Barcelona. Los programas de entrenamiento, de 4 años de duración, estaban diseñados de manera que el momento óptimo coincidiera con los Juegos Olímpicos pero teniendo en cuenta que durante esos años los componentes de estas selecciones no dejaron de participar en otro tipo de competiciones (a nivel individual o de selección) tanto nacionales como internacionales.

Las muestras de sangre fueron tomadas entre Noviembre del 90 y Febrero del 91, es decir, durante su tercer año de preparación. En ese momento, ni piragüistas, ni judocas, ni ciclistas estaban preparando competiciones pero, en cambio, los atletas estaban preparando unas pruebas de selección y los jugadores de baloncesto, preparaban los Campeonatos de Europa.

Por último, en uno de los deportes, ciclismo, tuvimos la oportunidad de volver a disponer de muestras de sangre en Junio del 92, es decir, justo antes del comienzo de los Juegos, por lo que pudimos comparar los resultados con los obtenidos anteriormente.

2.2. Obtención de células

2.2.1. Linfocitos de sangre periférica humana

Los linfocitos fueron obtenidos a partir de sangre venosa extraída de la vena antecubital del brazo por punción estéril a la que se incorpora como anticoagulante citrato sódico (10ml de sangre:1ml citrato sódico).

El aislamiento de las células se realizó inmediatamente después de la extracción mediante centrifugación en gradiente de densidad (130). Para ello, a 3 ml de Mono-Poly Resolving Medium (M-PRM) (Flow) de densidad específica 1114, añadimos 3,5 ml de sangre deslizándola suavemente por las paredes del tubo para evitar que se mezclen. Después se centrifugan a 1600 rpm (300xg) durante 30 min, quedando los hematíes en el fondo del tubo, el plasma en la parte superior y en medio dos halos de color blanquecino. De estos dos halos, el superior corresponde a los leucocitos mononucleares y el inferior a los polimorfonucleares neutrófilos. El halo de linfocitos fue extraído cuidadosamente con una pipeta Pasteur y posteriormente lavado 3 veces con solución salina tamponada de fosfatos (PBS) (1500 rpm, 10 min). Finalmente, se cuentan los linfocitos en un hemocitómetro de Neubauer y se ajusta a 1×10^6 linfocitos/ml medio RPMI (Gibco) suplementado al 10% con suero fetal de ternera (SFT) (Gibco) y 1% de gentamicina (1mg/ml, Gibco), estando así las células preparadas para la experimentación.

2.2.2. Obtención de Polimorfonucleares Neutrófilos (PMNs)

Estas células fueron aisladas siguiendo el mismo procedimiento que para los linfocitos de sangre periférica humana. De los dos halos obtenidos al centrifugar la sangre con M-PRM recogemos con pipeta Pasteur el halo inferior y lo lavamos 3 veces con PBS. Antes del último lavado, llevamos a cabo un choque hipotónico

con agua destilada durante 1 min a 3000 rpm (600xg) con el fin de eliminar la contaminación con hematíes. Por último, los PMNs fueron ajustados a 1×10^6 PMNs/ml medio Hank's y utilizados para los distintos ensayos de la función fagocítica.

2.3. Viabilidad celular

La viabilidad de las células que se utilizaron en las distintas técnicas fue comprobada mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripano (Merck). Este colorante se añade, al 0,5% en solución salina, sobre la suspensión celular (gota/gota) e inmediatamente después se contabilizan en hemocitómetro de Neubauer las células que aparecen teñidas de azul (muertas) y las que no lo están (vivas). Los resultados se expresan como porcentaje de mortalidad o viabilidad. En todos los experimentos que se llevaron a cabo, el porcentaje de viabilidad fue, aproximadamente, del 95%.

2.4. Recuento celular

Número absoluto de PMNs y linfocitos en sangre periférica

El recuento de PMNs y linfocitos se realizó en cámara de Neubauer en microscopio de contraste de fase con el objetivo de 40. Para ello hacemos una dilución con líquido de Türk de forma que a 950 μ l de sangre diluida al 50% con medio Hank's, le añadimos 50 μ l de dicho líquido de Türk que tiene la propiedad de lisar los hematíes y darles a los PMNs un color azul claro brillante diferenciándolos así de los linfocitos, que quedan transparentes. Los resultados se expresan como el número de células por mm^3 .

2.5. Obtención de suero y plasma

Para el análisis de los niveles hormonales (glucocorticoides, ACTH) y de opiáceos (β -endorfina) se extrajo sangre. Esta se utilizó, libre de anticoagulante para el estudio de los niveles séricos de glucocorticoides (cortisol), o con citrato sódico como anticoagulante para el estudio de los niveles plasmáticos de ACTH y β -endorfina. La sangre se obtuvo por punción estéril de la vena antecubital del brazo.

Una vez obtenida la sangre, el suero o el plasma se extrajeron por centrifugación a 1000xg durante 20 min a 4°C y fueron conservados a -70°C hasta su utilización.

2.6. Estudio de la función fagocítica

La función fagocítica conlleva una serie de etapas funcionales que deben efectuarse de forma previa o posterior al propio proceso de ingestión del material extraño por parte del fagocito. Estas células, si son de sangre circulante como es el caso de los PMNs neutrófilos, deben adherirse al endotelio vascular como paso previo a la diapédesis que les permite abandonar el vaso sanguíneo. Posteriormente se mueven dirigidas por un gradiente de sustancias atrayentes

creado por el foco de infección, hacia el mismo (quimiotaxis). Cuando entran en contacto con el material extraño se unen al mismo procediéndose a continuación a su ingestión y posterior destrucción, proceso que se lleva a cabo fundamentalmente mediante una actividad metabólica oxidativa, en la que tiene el último trimestre del año debiera ser bien acogida por e lugar un "estallido respiratorio" con activación de una NADPH oxidasa que transforma el oxígeno en ión superóxido, punto de partida para una serie de reacciones que originan nuevos radicales de oxígeno que permiten la destrucción del agente ingerido.

A continuación pasaremos a explicar la metodología utilizada para el estudio de algunas de las diferentes fases de dicho proceso fagocítico.

Capacidad de adherencia

Adherencia a fibra de nylon de PMNs de sangre:

Para estudiar la capacidad de adherencia al endotelio vascular se utilizó el método de adherencia a lana de nylon de McGregor y cols. (131) ligeramente modificado por Rodriguez y cols. (132). Para ello, una mezcla formada por 0,5ml de sangre, en el que previamente se efectuó el recuento de PMNs y linfocitos con el líquido de Türk como ya se comentó, y 0,5 ml de Hank's fue introducida en columnas de adherencia preparadas en nuestro laboratorio y consistentes en pipetas Pasteur en las que se empaquetaban 50 mg de lana de nylon con una altura de 1,25 cm. Pasados 10 min el efluente ha caído por gravedad, procediéndose en el mismo al recuento de PMNs. El volumen recogido corresponde aproximadamente a un 75% del volumen inicial de la mezcla (1 ml) y esta variación no fue considerada puesto que el recuento de PMNs realizado antes y después de pasar por la fibra fue referido al número de células/ml de sangre inicial o efluente.

La diferencia entre los PMNs presentes en la mezcla inicial y los presentes en el efluente después de pasar por la fibra nos da el número de los que se han adherido. El porcentaje de PMNs adheridos, que se expresa como Índice de Adherencia (I.A.), se calculó según la ecuación:

$$I.A. = \frac{(PMNs/ml\ muestra - PMNs/ml\ efluente) \times 100}{PMNs/ml\ muestra}$$

Movilidad dirigida o quimiotaxis

Para estudiar la propiedad de movilidad de las células fagocíticas se utilizó la técnica descrita por Boyden (133) y Fontan y cols. (134), ligeramente modificada por Rodriguez y cols. (132). Se utilizaron cámaras de Boyden, de forma circular y consistente en dos compartimentos separados por un filtro poroso de celulosa con tamaño de poro variable, aunque nosotros utilizamos filtros con poros de 3 µm de diámetro.

Una vez que las cámaras han sido montadas y selladas, se llena el compartimento inferior introduciendo 0,4 ml de una sustancia quimioatrayente, en este caso péptido formilado (fmet-leu-phe) a una concentración final de 10⁻⁸ M, y en el com-

partimento superior se introducen 0,3 ml de la suspensión celular, PMNs ajustados a 1×10^6 células/ml Hank's. Posteriormente se incuban las cámaras a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, las cámaras son desmontadas y los filtros extraídos, fijados y teñidos como se indica a continuación (indicamos el orden y el tiempo de permanencia en cada uno de los reactivos): metanol 50% (5'), etanol 75% (5'), agua destilada (2'), hematoxilina (10') y agua destilada (2').

En los filtros, una vez fijados y teñidos, se procede al recuento en microscopio y con objetivo de inmersión, del número de células que aparecen en 16 campos elegidos al azar en la cara inferior de los mismos. El resultado se expresa como Índice Quimiotáctico (I.Q.).

Fagocitosis o ingesta de partículas inertes (bolas de látex)

Este estudio se llevó a cabo siguiendo la técnica de De la Fuente (135) ligeramente modificada. Se siguió el siguiente proceso: en cada pocillo de placas MIF (Sterilin) se dispensaron 200 µl de la suspensión celular, PMNs (1×10^6 células /ml Hank's), tras 30-45 min de incubación a 37°C (tiempo suficiente para conseguir la adherencia de las células al plástico formando una monocapa), los pocillos fueron lavados con abundante cantidad de PBS a 37°C. Posteriormente se añadieron 200 µl de medio Hank's y 20 µl de bolas de látex (1,091 µm de diámetro y al 1% en PBS, Sigma). Las placas fueron entonces incubadas a 37°C durante 30 min y posteriormente lavadas, también con PBS a 37°C, para arrastrar el látex que no ha sido fagocitado. A continuación los pocillos se fijaron en metanol al 50% durante 5 min y se tiñeron con eosina-hematoxilina durante 1 min, lavándolos después con agua en abundancia para eliminar el exceso de colorante. Una vez secas las placas, se procedió al recuento en el microscopio, con objetivo de inmersión, del número de bolas de látex fagocitadas o ingeridas por cada célula. El resultado se expresó como Índice de Fagocitosis (I.F.), que representa el número de partículas ingeridas por cada 100 PMNs.

Digestión del material fagocitado

A la hora de estudiar la capacidad de destrucción del material ingerido por los PMNs neutrófilos de sangre periférica humana, se valoró la producción de un metabolito oxidativo: el ión superóxido (O₂⁻). Este metabolito se produce porque el estallido respiratorio que tiene lugar para destruir el material ingerido activa una NADPH oxidasa que con NADPH y O₂ produce dicho ión. El ión superóxido (O₂⁻) se midió gracias a su gran capacidad para reducir compuestos, utilizando el nitroazul de tetrazolio (NBT) que es convertido en proporción equimolar, en un formazán que es detectable por espectrofotometría (136).

Test de Reducción de Nitroazul de Tetrazolio (NBT)

Se realizó siguiendo el método descrito por De la Fuente (135) ligeramente modificado por Nuñez y cols. (137).

En tubos de vidrio se dispensaron 250 µl de las suspensiones celulares y 250 µl de NBT (1 mg/ml, Sigma). A la mitad de las muestras se les añadió 25 µl de bolas

de látex (1,091 μ m diámetro y al 1% en PBS), constituyendo las muestras que denominamos "estimuladas"; a la otra mitad de las muestras se les añadió 25 μ l de medio (Hank's), siendo éstas las muestras "no estimuladas". Posteriormente, la totalidad de las muestras fueron incubadas a 37°C en baño con agitación suave durante 1 hora. Después de este tiempo, se detuvo la reacción de reducción del NBT añadiendo a cada tubo 2,5 ml de CIH 0,5N. A continuación, y después de centrifugar a 5000 rpm durante 30 min, se observa un precipitado de color azul violeta que corresponde al formazán que se ha formado tras la reducción del NBT, siendo este color más intenso en las muestras "estimuladas" que en las "no estimuladas". Los tubos son decantados con cuidado de no arrastrar el precipitado y se les añade 1ml de dioxan para producir la rotura celular y liberar así el formazán. Tras centrifugar de nuevo durante 30 min a 5000 rpm, se leyó la absorbancia de los sobrenadantes en un espectrofotómetro a 525 nm. Como blanco se utilizó el sobrenadante de un tubo al que fue añadido al empezar la técnica, 250 μ l de medio de cultivo sin células y que fue procesado igual que el resto. Los resultados se expresan con el valor de la densidad óptica (D.O.).

2.7. Estudio de la función de linfocitos

Respuesta proliferativa de linfocitos

Para el estudio de la respuesta proliferativa de los linfocitos hemos utilizado el test de transformación linfoblástica (TTL). El fundamento de esta técnica se basa en que, los linfocitos cultivados en medio adecuado, en presencia de células presentadoras y estimulados con un mitógeno, sufren una transformación y pasan a ser linfoblasto con capacidad de sufrir mitosis. Estos linfoblastos, por tanto, sintetizan ADN por lo que añadiendo un precursor de la síntesis marcado radiativamente se puede medir el grado de su incorporación en un contador de radiactividad, es decir, el grado de proliferación de estos linfocitos.

El mitógeno utilizado fue fitohemaglutinina (PHA, Flow) a una concentración de 20 μ g/ml. Como precursor de la síntesis de ADN marcado radiativamente se empleó timidina tritiada (3H-T, Nuclear Ibérica), a una concentración de 0,5 μ Ci/pocillo.

Test de transformación linfoblástica

El protocolo seguido fue el siguiente: en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Costar), añadimos 200 μ l/pocillo de las suspensiones celulares, ajustadas a 1x10⁶ células/ml de medio RPMI completo (con 10% de suero fetal de ternera descomplementarizado por calentamiento a 56° durante 30min y 1% de gentamicina). A continuación se añaden 20 μ l del mitógeno correspondiente o 20 μ l de medio (controles), haciéndose todos los ensayos por triplicado. Las placas son incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad durante 48 horas, al cabo de las cuales, se añadieron 1 μ Ci/pocillo de timidina tritiada. Las placas son incubadas de nuevo, en las mismas condiciones, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se recogen mediante un recolector de células, en papel Wattman. El grado de incorporación se mide en un contador de centelleo LKB y los resultados se expresan como el porcentaje de incorporación, dando el valor 100 a los controles, es decir, a las células cultivadas en ausencia del mitógeno.

2.8. Valoración de ácido ascórbico (AA)

Básicamente, para la valoración de los niveles de ácido ascórbico que contienen los linfocitos y PMNs de sangre periférica humana, se siguió la metodología descrita por Hernanz en 1988 (138), ligeramente modificada por nosotros, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (WATERS) y cuyo protocolo resumimos a continuación:

Preparación de la fase móvil

Tras varios ensayos, se utilizó una fase móvil en la que la proporción de los disolventes agua/metanol es 60/40, y el pH: 6,0. Dicha fase móvil está constituida por una solución 10 mM de formiato amónico (Mërk) que contenía 12 mM de cloruro de tetrahexil amonio (que actúa como contraión)(Mërk).

Preparación de las muestras estándar

Se preparó una solución madre de ácido ascórbico (5,68 mM, Mërk): 50 mg de ácido ascórbico en 50 ml de 0,3 mol/l de ácido trifluoroacético (TFA)(Mërk) en presencia de 10 mmol/l de 1,4 ditioeritritol (DTE)(Mërk) como antioxidante, que fué conservada en alícuotas de 500 µl a -20°C hasta el momento de su utilización. Cada día de valoración se preparaban 5 estándares que contenían 2,84; 1,42; 0,71; 0,36 y 0,18 nmoles de ácido ascórbico por cada 50 µl.

Preparación de las muestras problema

En nuestros ensayos de valoración de ácido ascórbico utilizamos varios tipos de muestras problema aunque, básicamente, la preparación de las muestras es la misma.

Alícuotas de 500 µl de la suspensión celular (linfocitos o, PMNs neutrófilos), en los que previamente se había contabilizado el número de células, se añadieron 500 µl de TFA 1N en presencia de 1,4 ditioeritritol 1 mM como antioxidante. Las suspensiones se conservan, en estas condiciones, a -20°C hasta el momento de su utilización. Como paso previo a la valoración del contenido de ácido ascórbico, se procedió al liofilizado de las muestras para eliminar el TFA, reconstituyéndose las muestras con 500 µl de fase móvil, añadiendo también el antioxidante (DTE 1mM). Posteriormente, son gasificadas con helio, agitadas en un vortex hasta la completa resuspensión del liofilizado, y centrifugadas durante 5 min a 5000 r.p.m. La valoración de los niveles de AA se llevó a cabo en los sobrenadantes.

Medida del ácido ascórbico

Alícuotas de 80 µl (cuando el loop es de 50 µl) de cada muestra, procesada como se ha indicado anteriormente, se inyectaron en el cromatógrafo de HPLC que contiene una columna de fase reversa C18 y donde el flujo de la fase móvil es de 1 ml/min. La cuantificación del AA se realizó por absorbancia en UV a 265 nm.

La relación entre la absorción a 265 nm y la cantidad de AA inyectada como estándar fué lineal entre 2 y 110 ng. La sensibilidad del método permitió medir con discriminación apropiada una cantidad de 2 ng de AA por inyección.

Finalmente, los resultados se expresaron en nmol/10⁸ células de la suspensión.

2.9. Valoración de vitamina E

Para la determinación de los niveles de vitamina E (alfa-tocoferol) en linfocitos y PMNs de sangre periférica, se siguió la metodología descrita por Shearer en 1986 (139) ligéramente modificada.

Preparación de las muestras

Brevemente, el protocolo es el siguiente: a 100 µl de suspensión celular (linfocitos o PMNs) se le añaden 100 µl de una solución de acetato de alfa-tocoferol (Sigma), a una concentración aproximada de 50 µg/ml, que actúa como estándar interno, agitándose durante 30 s. Se añaden, como solvente de extracción, 200 µl de n-hexano agitándose de nuevo durante 30 s. A continuación las muestras se centrifugan durante 5 min de forma que se separan dos fases: una superior que contiene el hexano y la inferior que es la fase acuosa-etanol. La capa superior del hexano, que contiene el alfa-tocoferol y el acetato de alfa-tocoferol es evaporada en seco mediante una corriente de nitrógeno. Por último e inmediatamente antes de la inyección en el HPLC, el residuo lipídico es reconstituido con 100 µl de etanol.

Condiciones del ensayo de HPLC

Fase móvil: 7 % (v/v) diclorometano en metanol.

Columna: Spherisorb-ODS 2, de dimensiones 12,5 x 5 mm.

Flujo: 1 ml/min.

Detector: U.V. de longitud variable. Se mide a 292 nm.

Los resultados se expresaron en nmol/10⁸ células de la suspensión.

2.10. Valoración de Superóxido Dismutasa (SOD)

Se utiliza la técnica de Flohe y Otting (140) modificada.

La medida de la actividad SOD se basa en la inhibición de la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por radicales superóxido producidos mediante un sistema xantina-xantina oxidasa. La reducción del NBT se mide en un espectrofotómetro a 560 nm durante varios minutos. Los resultados se expresan en pg/10⁸cel.

2.11. Determinación de malondialdehído (MDA)

Se realiza siguiendo la técnica descrita por Esterbauer y cols. (141), ligéramente modificada. Básicamente el protocolo es el siguiente: a 100 µl de las suspensio-

nes celulares (linfocitos o PMNs) se le añaden 100 μ l de acetonitrilo y se agitan. A continuación se centrifuga a 2500xg durante 10 min y se recoge el sobrenadante, 20 μ l del cual es inyectado en el HPLC. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo : 0,03 M Tris pH 7,4 (1:9) a un flujo de 1 ml/min, y la columna, una Brownlee AS-MP de 10 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno. La detección se realizó en la región de ultravioleta a 270 nm.

Las concentraciones de MDA utilizadas para la calibración de este método de determinación por HPLC se extrajeron por su reacción con el ácido tiobarbitúrico, según la técnica de Heath y Packer (142).

2.12. Valoración de los niveles séricos de cortisol

El glucocorticoide valorado fue el más abundante en el ser humano: el cortisol, el cual se valoró en el suero de los distintos grupos experimentales mediante RIA comercial (IDS), basado en un ensayo de unión competitiva antígeno-anticuerpo, utilizando tubos recubiertos con anticuerpo anti-cortisol.

La sensibilidad del ensayo es de 7 nmo/L. Los resultados se expresan en nanomoles de cortisol por litro de suero (nmol/L).

2.13. Valoración de ACTH en plasma

Los niveles plasmáticos de hormona adrenocorticotropa (ACTH) se valoraron mediante RIA comercial (NICHOLS). Se basa en la formación de un complejo tipo "sandwich" entre la ACTH presente en la muestra y dos anticuerpos específicos para dicha molécula: uno monoclonal, que se une a la región N-terminal de ACTH y que está marcado radiactivamente, y otro policlonal, que se une a la región C-terminal de la molécula y que está unido a una fase sólida, formándose el complejo: Fase sólida-Ac(p)-ACTH-Ac(m)*. La formación de este complejo ocurre sólo en presencia de moléculas intactas de ACTH, por lo que, la radiactividad medida es directamente proporcional a la cantidad de ACTH intacta en la muestra.

La sensibilidad del ensayo es de 1 pg/ml. Los resultados se expresan en picogramos de ACTH por mililitro de plasma (pg/ml).

2.14. Valoración de beta-endorfina en plasma

Los niveles plasmáticos de β -endorfina se valoraron mediante RIA comercial (NICHOLS). Está basado en la incubación de las muestras con dos anticuerpos: uno inmovilizado sobre una fase sólida y otro marcado radiactivamente. Las β -endorfinas presentes quedan unidas a ambos anticuerpos formando un complejo tipo "sandwich": Fase sólida-Ac- β -endorfina-Ac*. La concentración de β -endorfina en la muestra es directamente proporcional a la radiactividad medida.

La sensibilidad del ensayo es de 14 pg/ml. Los resultados se expresan en pg/ml.

2.15. Estudio estadístico

Los resultados se expresan mediante la media aritmética y desviación estandar del número de datos obtenidos en cada ensayo.

La normalidad de la distribución de las variables se analizó mediante el Test de Normalidad Kolmogorov-Smirnov. La comparación de las medias normales entre dos grupos experimentales se efectuó por el test de la t de Student, teniendo en cuenta cuando las muestras eran apareadas o no apareadas. En el caso de más de dos muestras, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA). Cuando se obtuvieron diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación de pares de muestras (Fisher PLSD) para comprobar cuál o cuales eran las muestras que diferían del resto de las analizadas.

Se consideró que no había significación cuando el valor de la probabilidad de significación (p) fue mayor de 0,05. Se dió el valor de "significativo" para $p < 0,05$; de "muy significativo" para $p < 0,01$ y de "altamente significativo" para $p < 0,001$.

3. RESULTADOS

3.1. ESTADO INMUNOLOGICO DE LOS DEPORTISTAS DE ALTO RENDIMIENTO

Empezaremos estudiando el estado inmunológico que presentan toda una serie de deportistas de élite en comparación con el de individuos que realizan ejercicios o deportes de forma moderada y con el de individuos sedentarios.

Los resultados se presentan para cada uno de los ensayos, en tablas o figuras, en las cuales se recogen las medias \pm desviaciones estándar del número de experimentos realizados por duplicado o triplicado. En todas ellas aparecen las siguientes abreviaturas, correspondientes a los distintos grupos experimentales: **C** o grupo de individuos **controles** o sedentarios; **EM** o grupo de individuos que realizan **ejercicio de forma moderada**; **P** o **piragüistas**; **J** o individuos cuyo deporte es el **judo**; **A** o grupo de **atletas** de fondo y medio fondo; **B** o jugadores de **baloncesto** y **CC** o grupo de **ciclistas**.

El grado de significación se representa con las letras a, b, y c: **a: $p < 0,05$** ; **b: $p < 0,01$** y **c: $p < 0,001$** con respecto al grupo control (**C**) o sedentarios y con los números 1, 2 y 3: **1: $p < 0,05$** ; **2: $p < 0,01$** y **3: $p < 0,001$** respecto al grupo de individuos que realizan ejercicio de forma moderada (**EM**).

3.1.1. Parámetros fisiológicos de los deportistas

Los parámetros fisiológicos (antropométricos, ergométricos y espirométricos de los distintos grupos de deportistas se presentan en la Tabla 1.

3.1.2. Concentración de linfocitos y PMNs neutrófilos en sangre periférica

A continuación, en la Tabla 2, se muestra la concentración de células sanguíneas objeto de nuestro estudio (linfocitos y PMNs neutrófilos) en los diferentes grupos experimentales. Los resultados se presentan como el número de células ($\times 10^6$)/ml.

Como podemos observar, la concentración de linfocitos disminuye significativamente en todos los grupos experimentales respecto a los controles sedentarios. En cuanto a los neutrófilos hay gran variedad en los resultados obtenidos. Destaca el aumento en los judocas y la disminución en los ciclistas.

Parámetros antropométricos				
DEPORTES	EDAD (años)	PESO (Kg)	TALLA (cm)	
PIRAGÜISMO	22 ± 4	76 ± 6	175 ± 6	
JUDO	23 ± 4	81 ± 12	179 ± 8	
ATLETISMO	27 ± 5	62 ± 5	173 ± 6	
CICLISMO	18 ± 1	70 ± 4	179 ± 5	
BALONCESTO	18 ± 1	80 ± 12	192 ± 9	

Parámetros ergométricos			
DEPORTES	TIEMPO (min)	TRABAJO (wat)	F.C.M. (ppm)
PIRAGÜISMO	11 ± 1	434 ± 32	190 ± 9
JUDO	9 ± 1	401 ± 25	187 ± 4
ATLETISMO	12 ± 1	382 ± 15	189 ± 4
CICLISMO	19 ± 1	492 ± 13	192 ± 3
BALONCESTO	8 ± 1	388 ± 32	195 ± 3

Parámetros espirométricos				
DEPORTES	V.E. (l/m)	VO₂ (l/min)	VO₂ (ml/K.min)	PULSO O₂
PIRAGÜISMO	183 ± 22	5 ± 1	69 ± 3	28 ± 2
JUDO	165 ± 10	5 ± 1	56 ± 3	24 ± 1
ATLETISMO	158 ± 6	4 ± 1	72 ± 3	24 ± 2
CICLISMO	188 ± 11	5 ± 1	75 ± 2	27 ± 1
BALONCESTO	158 ± 12	4 ± 1	52 ± 3	21 ± 1

Cada valor representa la media ± D.E. de los parámetros correspondientes a 10 individuos.

TABLA 1. Parámetros antropométricos, ergométricos y espirométricos de los distintos grupos de deportistas de élite.

	LINFOCITOS	NEUTROFILOS
C	5,7 ± 1,3	2,8 ± 1,0
EM	2,9 ± 1,3c	3,0 ± 1,0
P	2,8 ± 0,6c	2,0 ± 0,41
J	3,2 ± 1,6c	5,1 ± 3,0b,2
A	1,9 ± 0,6c,1	3,6 ± 1,5
B	2,8 ± 1,1c	2,1 ± 0,2
CC	3,2 ± 0,7c	1,7 ± 0,4b,2

Cada valor representa la media ± D.E. de 10 valoraciones.
Significación: b: p<0,01; c: p<0,001 respecto C. 1: p<0,05; 2: p<0,01 respecto EM.

TABLA 2. Concentración células de sangre periférica (nº cél x 106/ml).

3.1.3. Función fagocítica de PMNs neutrófilos

Los resultados se presentan en la Fig.1. Esta figura consta de 5 gráficas que representan las etapas más importantes del proceso fagocítico: adherencia a lana de nylon (semejante a la adherencia al endotelio vascular que tiene lugar "in vivo") expresado como Índice de Adherencia (I.A.); movilidad dirigida o quimiotaxis (I.Q.); ingestión o fagocitosis de partículas inertes (I.F.) y producción de anión superóxido, hecho importante que tiene lugar en la destrucción o digestión del material ingerido, que se indica como capacidad de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), tanto en presencia (estimulada) como en ausencia (no estimulada) del material a ingerir.

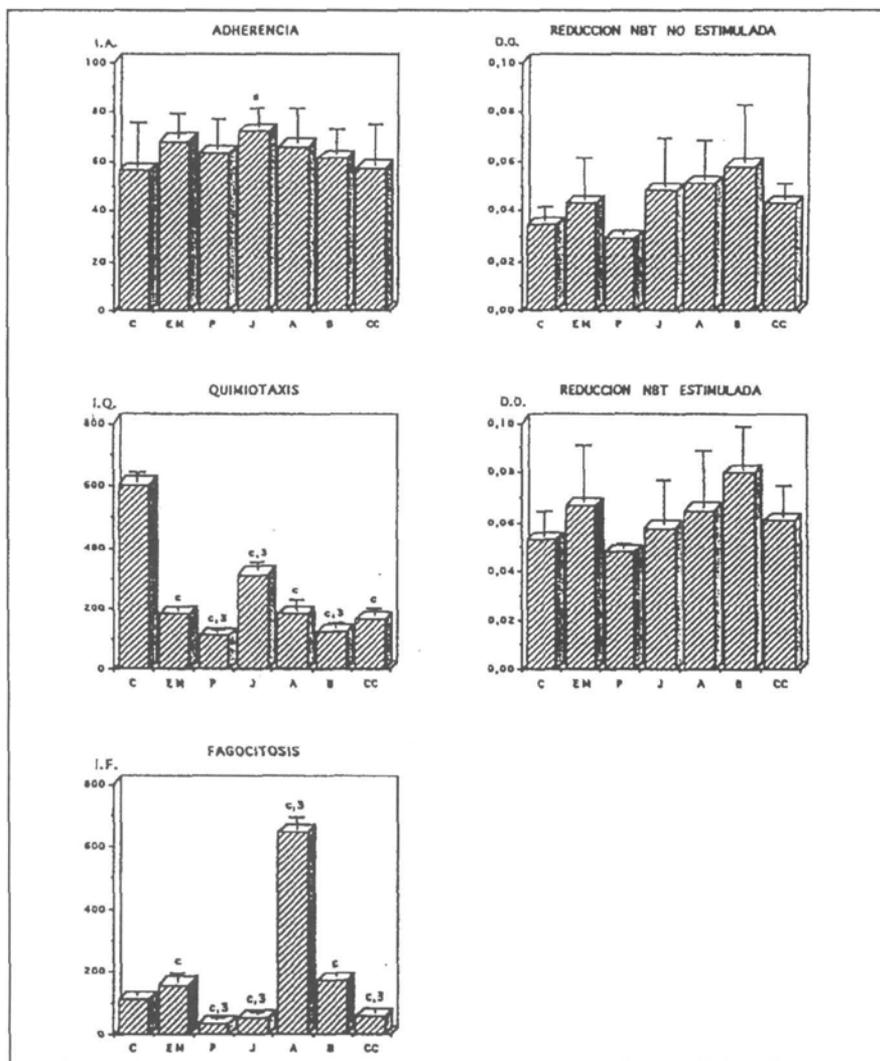


Figura 1. Cada valor representa la media ± D.E. de 10 valoraciones realizados por duplicado. Significación: a: p < 0,05; c: p < 0,001, respecto a C. 3: p < 0,001, respecto a EM.

Analizando por etapas: en la adherencia no se producen cambios entre los distintos grupos (solo existe una diferencia significativa en judocas respecto a controles). En la quimiotaxis se produce una disminución altamente significativa en todos los grupos de deportistas tanto respecto a los controles como a los individuos que realizan ejercicio moderado. La fagocitosis es variable dependiendo de los grupos: respecto a controles, aumenta en el ejercicio moderado, atletismo y baloncesto, disminuyendo en el resto (ocurre igual respecto a ejercicio moderado). En la capacidad de producción de ión superóxido no se producen cambios.

3.1.4. Capacidad de proliferación de linfocitos

Se estudia la capacidad de proliferación de los linfocitos de sangre periférica en respuesta a un mitógeno. En este caso el utilizado fue Fitohemaglutinina (PHA) a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos se representan como porcentaje de proliferación de los linfocitos y se muestran en la Fig. 2.

Como puede observarse, respecto a los controles se producen disminuciones significativas en los grupos de deportistas (sobre todo atletas y jugadores de baloncesto), con excepción de los piragüistas que muestran un aumento altamente significativo de su capacidad de proliferación. Cuando comparamos a los deportistas con los individuos que realizan deporte de forma moderada (EM), el comportamiento de los distintos grupos es similar al comentado anteriormente. Tan solo en el caso de los ciclistas no se producen variaciones respecto a los individuos que realizan ejercicio moderado.

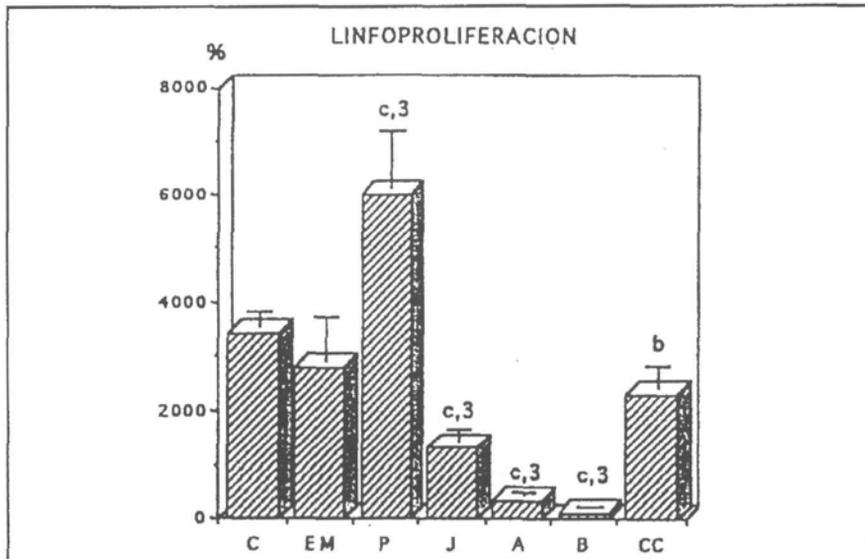


Figura 2. Cada valor representa la media \pm D.E. de 10 valoraciones realizadas por triplicado. Significación: c: $p < 0,001$ respecto a C; 3: $p < 0,001$ respecto a EM.

3.1.5. Niveles hormonales

Los resultados obtenidos en relación a los niveles de cortisol y ACTH se presentan en la Fig. 3.

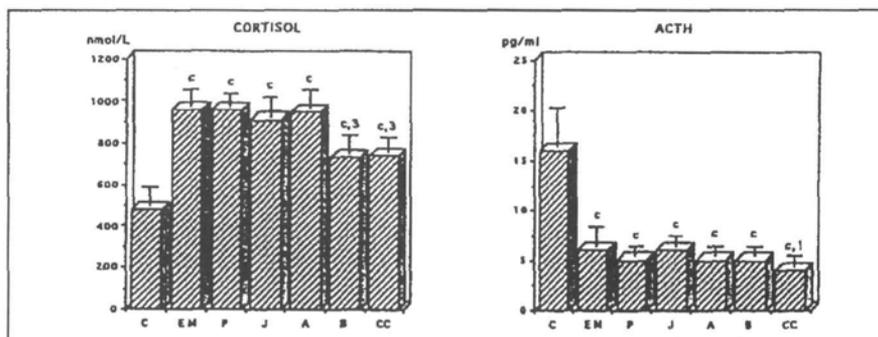


Figura 3. Cada valor: media \pm D.E. de 10 valoraciones por duplicado. Significación: c: $p < 0,001$ respecto C; 1: $p < 0,05$; 3: $p < 0,001$ respecto EM.

Los niveles de cortisol muestran un aumento altamente significativo en todos los grupos experimentales, tanto de deportistas como de individuos que realizan ejercicio moderado, respecto a los sujetos controles. Este aumento es menor en los jugadores de baloncesto y en los ciclistas, de forma que hay diferencias altamente significativas respecto al grupo EM.

En cuanto a los niveles de ACTH, todos los grupos presentan una disminución altamente significativa en esta hormona respecto a los individuos sedentarios.

3.1.6. Niveles β -endorfina

En la Fig. 4 se representan los resultados obtenidos en relación a la medida de los niveles de β -endorfina plasmáticas en los distintos grupos experimentales.

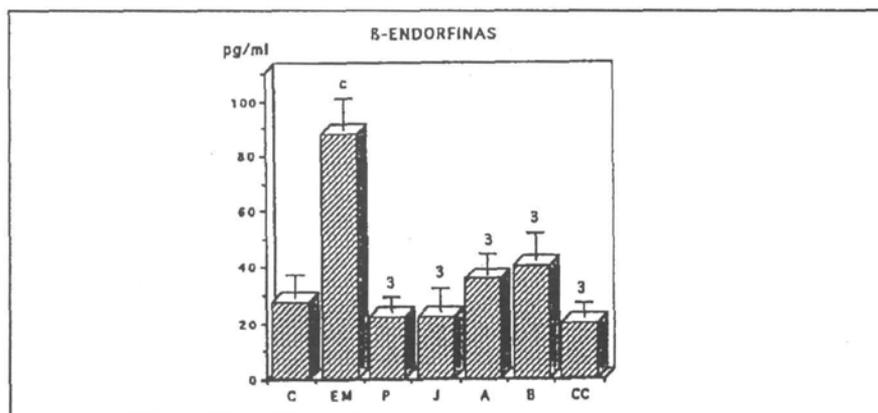


Figura 4. Cada valor representa la media \pm D.E. de 10 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación: c: $p < 0,001$, respecto a C; 3: $p < 0,001$, respecto a EM.

Puede observarse que los niveles de β -endorfinas prácticamente no varían entre los controles y los grupos de deportistas de élite. Sin embargo, los individuos que realizan deportes de forma moderada muestran una elevación altamente significativa de tales niveles con respecto a los individuos sedentarios, por lo que los deportistas presentan disminuciones estadísticamente significativas en los niveles de β -endorfinas respecto a EM.

3.1.7. Niveles de antioxidantes

Antioxidantes no enzimáticos

Como ejemplo de antioxidantes no enzimáticos medimos los niveles de ácido ascórbico (Vit. C) y α -tocoferol (Vit. E) en los linfocitos y PMNs neutrófilos de sangre periférica de los grupos experimentales. Los resultados se presentan en la Fig. 5.

En los linfocitos observamos que en general, respecto al grupo control, el resto de los grupos experimentales presentan niveles más altos tanto de Vit C (excepto en el baloncesto) como de Vit. E. Destacan sobre todo los altísimos niveles de Vit C en los atletas.

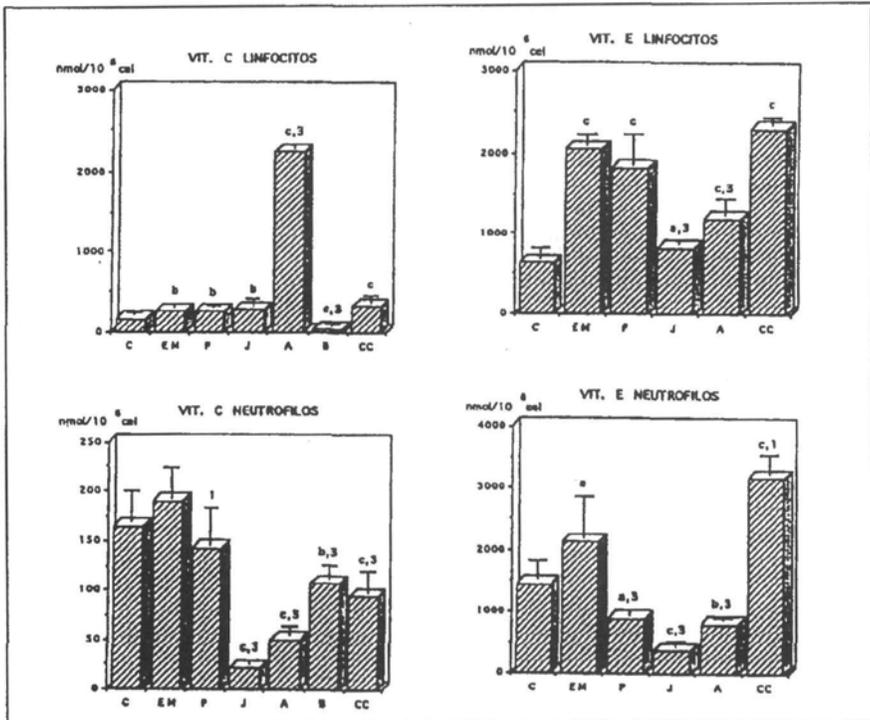


Figura 5. Cada valor: media \pm D.E. de 10 experimentos valorados por duplicado. Significación: a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$ resp. C. 1: $p < 0,05$; 3: $p < 0,001$ respecto EM.

Los neutrófilos presentan gran variedad de resultados: en general, los deportistas muestran niveles más bajos de Vit C, tanto respecto a controles como al ejercicio moderado. Prácticamente igual ocurre con la Vit E, exceptuando el grupo de ciclistas.

Antioxidantes enzimáticos

Como ejemplo de antioxidante enzimático realizamos la medida de los niveles de superóxido dismutasa (SOD) en linfocitos y PMNs neutrófilos. Los resultados se presentan en la Fig. 6.

En los linfocitos se produce un aumento altamente significativo en la actividad de SOD, respecto a controles, en los grupos de individuos sometidos a ejercicio moderado y en los piragüistas, mientras que no se producen cambios en el resto de los grupos. En relación a EM sí aparecen disminuciones de SOD en los deportistas con excepción de los piragüistas.

En los neutrófilos se observa un aumento generalizado de los niveles enzimáticos en todos los grupos estudiados respecto a los individuos controles. Comparando los deportistas con los individuos sometidos a EM, también se produce un aumento de los niveles de SOD, excepto en los atletas, que presentan una disminución.

3.1.8. Peroxidación lipídica: Niveles de Malondialdehido

Para comprobar el grado de peroxidación lipídica hemos medido los niveles de malondialdehido (MDA) en linfocitos y PMNs neutrófilos. En la Fig. 7 se muestran los resultados:

Puede observarse como en los linfocitos de deportistas aparecen unos niveles inferiores de MDA (excepto los atletas, que tienen unos niveles significativamente superiores) respecto a los controles. Los individuos que hacen deporte de forma

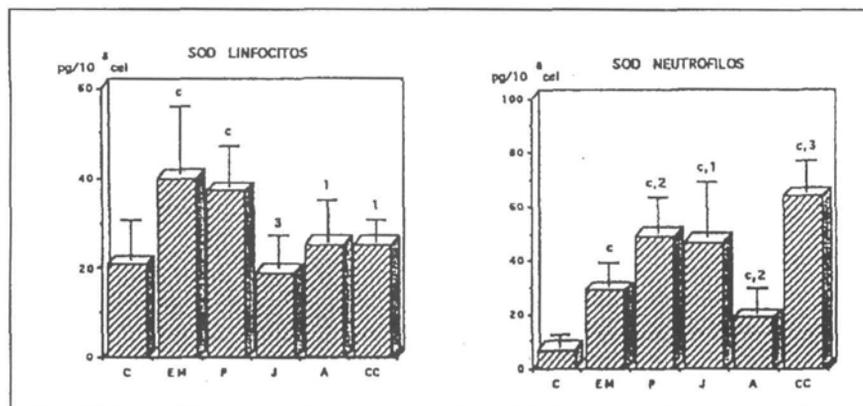


Figura 6. Cada valor: media \pm D.E. de 10 experimentos por duplicado. Significación: c: $p < 0,001$ respecto a C. 1: $p < 0,05$; 2: $p < 0,01$; 3: $p < 0,001$, a EM.

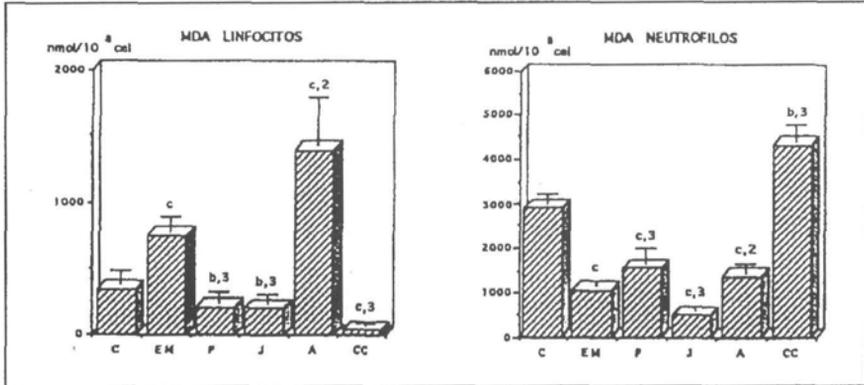


Figura 7. Cada valor: media \pm D.E. de 10 experimentos por duplicado. Significación: b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$ resp. C. 2: $p < 0,01$; 3: $p < 0,001$ respecto a EM.

moderada (EM) tienen niveles significativamente mayores de MDA que los controles sedentarios, que los piragüistas, judocas y ciclistas. Sin embargo, esos niveles son menores que los de los atletas.

En neutrófilos observamos que todos los grupos experimentales tienen niveles significativamente inferiores de MDA cuando los comparamos con los sedentarios, exceptuando los ciclistas. Respecto a EM, los grupos de piragüistas, ciclistas y atletas tienen niveles superiores, mientras que los judocas presentan niveles inferiores.

3.2. EFECTO DE UNA MAYOR INTENSIDAD DE ENTRENAMIENTO EN DEPORTISTAS

Como se comentó en el apartado de "Objetivos", en uno de los grupos de deportistas concretamente en los ciclistas, tuvimos la oportunidad de comprobar el efecto que produce el aumento de la intensidad del entrenamiento en la función inmune (PMNs neutrófilos y linfocitos), sobre los niveles hormonales (cortisol y ACTH) y péptidos opiáceos (β -endorfina). También sobre el contenido de un antioxidante: el ácido ascórbico de linfocitos y PMNs neutrófilos.

Para ello en este punto comparamos los resultados obtenidos en este grupo de deportistas durante dos momentos de su preparación para los Juegos Olímpicos: en **Febrero de 1991**, es decir, durante el tercer año de preparación (resultados expuestos en el apartado 4.11.1 junto al resto de los grupos de deportistas) y en **Junio de 1992**, es decir, justo antes de dichos Juegos Olímpicos. El nivel de significación se expresa como: £: $p < 0,05$; * : $p < 0,01$; §: $p < 0,001$, respecto a los datos de Febrero.

Como podremos observar en la Tabla 3, no existen unas diferencias generalizadas y significativas entre ambos periodos de entrenamiento a nivel de los parámetros estudiados. Así, no aparecen diferencias a nivel de la concentración de linfocitos y PMNs neutrófilos de sangre periférica.

	<u>FEBRERO'91</u>	<u>JUNIO'92</u>
Concentración:		
Linfocitos (célx106/ml)	3,2 ± 0,7	3,3 ± 1,3
Neutrófilos (célx106/ml)	1,7 ± 0,4	1,6 ± 0,5
Función PMNs N:		
Adherencia (I.A.)	57 ± 16	75 ± 14
Quimiotaxis (I.Q.)	165 ± 22	253 ± 31§
Fagocitosis (I.F.)	58 ± 12	79 ± 29
Red. NBT NE (D.O.)	,043 ± ,007	,035 ± ,013
Red. NBT E (D.O.)	,061 ± ,012	,087 ± ,018£
Función Linfocitos:		
Proliferación (%)	2300 ± 390	2606 ± 265
Hormonas:		
Cortisol (nmol/L)	740 ± 76	802 ± 90
ACTH (pg/ml)	4 ± 2	7 ± 1*
Opióides:		
β-endorfinas (pg/ml)	20 ± 5	44 ± 13*
Ac. Ascórbico:		
Linfocitos (nmol/108cél)	326 ± 86	24 ± 2§
Neutrófilos (nmol/108cél)	94 ± 22	69 ± 27

Cada valor representa la media ± D.E. de 10 valoraciones realizadas por duplicado o triplicado.

Significación: £: p<0,05; *: p<0,01; §: p<0,001, respecto a los resultados de Febrero.

TABLA 3. Efecto del incremento de la intensidad del entrenamiento en ciclistas.

En cuanto a la función fagocítica de los PMNs neutrófilos, en general se produce un aumento de las distintas etapas cuando mayor es la intensidad del entrenamiento (Junio) aunque sólo es significativo en la quimiotaxis y en la digestión estimulada del material ingerido.

La capacidad de proliferación de los linfocitos en respuesta al mitógeno PHA (20µg/ml) está ligeramente más estimulada en Junio que en Febrero aunque la diferencia no es significativa.

En relación a los niveles hormonales (cortisol y ACTH) se observa un aumento en Junio respecto a Febrero, que sólo es significativo en el caso de la ACTH.

En los niveles de β -endorfina se aprecia un aumento muy significativo cuando se incrementa la intensidad de los entrenamientos.

Por último, en relación al contenido de ácido ascórbico de las células estudiadas vemos que se produce una disminución cuando aumenta la intensidad de los entrenamientos, siendo altamente significativa en el caso de los linfocitos.

4. DISCUSION

La mayoría de la bibliografía que existe en relación al efecto del ejercicio físico sobre el SI en el ser humano hace referencia al efecto de ejercicios puntuales, periodos de entrenamiento o realización de ejercicios agudos después de periodos de entrenamiento, tanto en individuos sedentarios como en deportistas. Además, los datos se centran fundamentalmente a nivel de cuantificación celular, y en menor medida en la capacidad funcional de algún tipo celular concreto, generalmente el linfocito. Teniendo en cuenta las discrepancias que surgen a la hora de justificar el efecto beneficioso o perjudicial del deporte sobre el SI en relación al supuesto aumento de la susceptibilidad a infecciones entre los deportistas, nos pareció de gran interés realizar un estudio lo más completo posible, en el sentido de analizar la funcionalidad de los dos tipos de células inmunes más representativas: los linfocitos y los fagocitos. Además de estudiar el estado inmunológico también era importante poder relacionarlo con los niveles de hormonas o neuropéptidos relacionados con la situación de estrés, así como con antioxidantes celulares. Este estudio se efectuó en individuos, deportistas de élite y en los que realizan ejercicio de forma moderada, pero no inmediatamente después de una sesión de ejercicio sino en un momento cualquiera de descanso, puesto que lo que nos interesa es el estado habitual de estos individuos. Esto se planteó así ya que algunos autores como Caren (143) indican que el efecto del ejercicio sobre el SI no es debido al ejercicio como tal, sino más bien, al estrés asociado al mismo (144), y que las diferencias encontradas dependen del grado de estrés. En este estudio, además de comparar los resultados con los de individuos sedentarios, los comparamos también con un grupo de individuos que hemos denominado "ejercicio moderado" constituido por sujetos que realizan habitualmente ejercicio de gran variedad, puesto que son alumnos del primer curso del INEF o Instituto Nacional de Educación Física.

Además, en los ciclistas, pudimos estudiar el efecto de un programa de entrenamiento a largo plazo sobre la funcionalidad de dichas células inmunocompetentes, ya que valoramos todos los parámetros indicados en dos momentos de su programa de preparación, de cuatro años de duración: en el segundo año y justo antes de su participación en los Juegos Olímpicos.

4.1. ESTADO INMUNOLOGICO DE LOS DEPORTISTAS DE ELITE

En primer lugar observamos que todos los grupos experimentales presentan una concentración de linfocitos de sangre periférica significativamente menor que el grupo control. En general se ha descrito que durante (145) e inmediatamente después del ejercicio tiene lugar una linfocitosis (5,7,17,52,145,146,147), aunque al cabo de cierto tiempo ya no se detecta (17). De hecho, algunos autores indican que a partir de los 30 min de finalizado el ejercicio, esa linfocitosis se transforma en linfopenia (148).

El patrón en la concentración de neutrófilos es más variable, puesto que hemos encontrado que hay aumentos, disminuciones y también, grupos que no presentan cambios respecto al grupo de individuos sedentarios. Esta variabilidad también ha sido descrita por otros autores como Busse y cols. (149) y Simon (7), y parece que depende del porcentaje de linfocitos, puesto que se ha descrito que la linfocitosis que tiene lugar después del ejercicio es debida a la mayor liberación de adrenalina (150,151), lo que induciría un aumento de la liberación de linfocitos desde los órganos linfoides hacia la circulación (152,153) produciendo una variabilidad del porcentaje de PMNs en función del porcentaje de linfocitos.

En cuanto al estado inmunológico, a nivel de la función fagocítica de los PMNs neutrófilos observamos que todos los grupos experimentales presentan una menor capacidad de quimiotaxis respecto a controles y también, la mayoría, una menor capacidad de fagocitosis (excepto los grupos EM, atletismo y baloncesto). En el resto de las etapas del proceso fagocítico, adherencia y digestión no se observan modificaciones respecto a los controles. Existen pocas investigaciones en este campo en relación a los deportistas de élite ya que en general, la mayoría de los trabajos realizados sobre este tema se refieren al efecto del ejercicio sobre la función fagocítica de neutrófilos de individuos sedentarios y los resultados indican que se produce una estimulación asociada al ejercicio en ciertas etapas de dicho proceso fagocítico (38,154)

A nivel de la capacidad de proliferación de los linfocitos de sangre periférica en respuesta a mitógeno, en general todos los grupos de deportistas, exceptuando el grupo de piragüistas, presentan inhibición de esta capacidad, lo cual coincide con los resultados de otros autores (15) y en general con todos aquellos que asocian el ejercicio intenso con inmunosupresión (1,2,17). Por su parte, el grupo EM no presenta modificaciones respecto al grupo control, lo que podría estar relacionado con el carácter transitorio de los cambios asociados a cargas de ejercicio (155,156), de forma que esos cambios en los parámetros inmunes se producen inmediatamente después del ejercicio y al cabo de cierto tiempo vuelven a los valores basales o normales.

Por tanto y aunque existen excepciones puntuales parece que se puede hablar de una inmunosupresión (1, 2, 17) en los individuos que realizan deportes de élite, por lo menos en lo que se refiere a la función de linfocitos y a algunas etapas del proceso fagocítico de neutrófilos. Esta inmunosupresión no se extiende a los individuos que realizan ejercicio de forma moderada, donde la mayoría de los investigadores indican que se produce un aumento de la inmunidad (3, 5, 6, 11, 157, 158, 159, 160).

A nivel hormonal, todos los grupos experimentales presentan unos niveles significativamente elevados de cortisol y unos niveles significativamente inferiores de ACTH, respecto a los individuos sedentarios. Esos niveles elevados de cortisol, podrían ser debidos a cambios relativamente estables de los propios niveles basales de la hormona por la exposición prolongada a agentes estresantes (44). Además, se sabe que la secreción de esta hormona durante un largo periodo de tiempo puede tener un impacto fisiológico a largo plazo, probablemente porque halla una alteración en el número, densidad o funcionalidad de los receptores endocrinos (161). Los glucocorticoides circulantes, de los cuales el cortisol es el

más representativo, actúan sobre la pituitaria inhibiendo la secreción de ACTH (162,163). Por tanto es posible que los bajos niveles de ACTH sean consecuencia de un mecanismo de retroalimentación negativo de los niveles elevados de cortisol (164). Por otra parte, se ha comprobado que cuando los animales de experimentación son sometidos a periodos de entrenamiento crónico o a repetidas exposiciones al mismo tipo de estrés, presentan unos niveles de ACTH inferiores a animales controles (165,166). Estas evidencias podrían explicar los distintos niveles hormonales en los deportistas.

La elevación de los niveles de cortisol observada en el grupo EM podría ser consecuencia del estrés psicológico provocado por la propia extracción de sangre (167), puesto que este grupo no está acostumbrado a este protocolo como lo están los deportistas. En este caso, como el grupo EM presenta altos valores plasmáticos de cortisol pero no una disminución en la capacidad linfoproliferativa, esto implicaría que otros factores inciden en la relación glucocorticoide-respuesta linfoproliferativa. En este sentido las β -endorfinas podrían estar implicadas. En efecto, a los niveles de β -endorfina, sólo presentan un aumento significativo el grupo EM, mientras que el resto de los grupos experimentales presentan unos niveles comparables a los de los individuos sedentarios. Aunque el ejercicio suele ir acompañado por una elevación de los niveles de β -endorfina, también es cierto que dichos niveles vuelven al estado basal 60 minutos después de finalizado el mismo (45,46). Nuestros resultados no coinciden con los de algunos autores que afirman que después de ejercicios diarios los niveles de β -endorfina son superiores a los de controles sedentarios (47) porque hay una mayor producción de esos opioides endógenos y de la molécula precursora, la POMC.

Por último, en cuanto a los resultados obtenidos en relación a los niveles de antioxidantes intracelulares no enzimáticos (vit. C y vit. E), enzimáticos (SOD) y los niveles de peroxidación lipídica, medido como contenido de malondialdehído (MDA), los distintos grupos experimentales no presentan, en ningún caso, un perfil semejante ni que siga ninguna relación con los otros parámetros cuantificados. Esta gran variedad de resultados podría ser debida a un aspecto, que hasta ahora no hemos comentado pero que es muy típico dentro del mundo del deporte y entre los deportistas, como es el de la dieta y las suplementaciones, que se ha descrito que pueden intervenir en la modulación de los efectos endocrinos que produce el estrés físico (168). En este sentido y hasta ahora, lo más típico eran las suplementaciones con complejos de vitaminas y minerales, pero últimamente se están empezando a incluir toda una serie de compuestos como L-carnitina, antioxidantes tiólicos etc., en un intento de "mejorar" la capacidad y la realización física, retrasar la fatiga, etc. En este trabajo nos ha resultado imposible controlar este aspecto, entre otras causas, porque suele ser una información bastante reservada por parte de los responsables médicos y en muchas ocasiones, por puro desconocimiento por parte de los deportistas, aunque en ningún caso dudamos de la legalidad de dichas suplementaciones.

De los resultados obtenidos es difícil establecer una conclusión general sobre el estado inmunológico de los deportistas de élite, puesto que dichos resultados muestran una gran variabilidad. La mayoría de los autores que han trabajado con este tipo de deportistas hablan de una inmunosupresión asociada al entrenamiento de alta intensidad, pero también es cierto que la experimentación en esos

casos se realiza inmediatamente después de concluir una de esas sesiones de entrenamiento, momento en el que se produce esa inmunosupresión que podría ser temporal. Por otro lado también está bastante aceptado que los parámetros inmunológicos inmunodeprimidos vuelven a su nivel basal, como mucho, dentro de las 24 horas después del ejercicio. Volviendo a nuestros resultados y sin generalizar, parece que podríamos hablar de una cierta inmunosupresión que afectaría a algunas de las etapas del proceso fagocítico de los neutrófilos, sobre todo a la capacidad de quimiotaxis, y a la función de los linfocitos, por lo menos, a su capacidad de proliferación en respuesta a mitógenos in vitro. Lo que sí parece claro es que las respuestas inmunológicas están determinadas y moduladas por numerosos "factores" que pueden ser considerados, como son los umbrales de intensidad y duración del ejercicio, necesarios para definir las respuestas, la capacidad de adaptación del organismo como resultado del entrenamiento, la emotividad del individuo, situación en la que se realiza el ejercicio, condiciones ambientales, dieta, suplementos dietéticos, presiones sociales, etc.

4.2. EFECTO DE UNA MAYOR INTENSIDAD DE ENTRENAMIENTO

En este apartado discutiremos los resultados obtenidos cuando comparamos los parámetros inmunes, de hormonas, de β -endorfinas y de antioxidantes de uno de los grupos de deportistas (ciclistas) que han llevado a cabo un programa de entrenamiento de intensidad creciente que ha sido preparado para llegar al momento de la competición en el mejor estado de forma posible.

En general, los estudios realizados sobre el efecto de diferentes intensidades de entrenamiento se llevan a cabo en cortos periodos de tiempo (20,21,169), pero nunca tan a largo plazo como en nuestro caso, donde existe una diferencia de 16 meses entre las dos medidas.

Está bastante aceptado que el entrenamiento da lugar a un aumento de la inmunidad (170) y a una disminución de la susceptibilidad a enfermedades cuando se realiza de forma regular, moderada y controlada (1). Es lógico pensar por tanto, que igual que el entrenamiento realizado de forma controlada da lugar a una serie de cambios adaptativos que capacitan al organismo para responder a las exigencias de demandas funcionales que aumentan progresivamente (171,172), también se produzcan esos cambios adaptativos a nivel de SI, dando como resultado una inmunidad aumentada al igual que aumentan las funciones de otros sistemas del organismo (173), entre los que podríamos destacar el aumento en la capacidad funcional de los sistemas endocrinos (44).

Los resultados que hemos obtenido en relación a la función de neutrófilos y de linfocitos estarían de acuerdo con esta última teoría puesto que, en general, encontramos un ligero aumento tanto en distintas etapas del proceso fagocítico de neutrófilos como en la capacidad de respuesta proliferativa de los linfocitos. Por tanto, aunque se produzca un incremento en la intensidad de entrenamiento, si está controlado y no se llega al "sobrentrenamiento" se puede producir una "adaptación" de la función inmune (173), como ocurre en muchos deportistas de élite.

Los resultados obtenidos respecto a los niveles de las hormonas de estrés (cortisol y ACTH) y de β -endorfina justo antes de su participación en los J.J.O.O., nos

indican que se ha producido un incremento de dichos niveles hormonales, significativo tanto en ACTH como en la β -endorfina. Es lógico pensar en la existencia de un aumento en los niveles de estrés, probablemente más psicológico que físico (51) debido en este caso a la proximidad de un evento tan importante como los J.J.O.O. y para el que estos deportistas se han estado preparando durante 4 años. Además, que sea más un estrés psicológico que físico se confirmaría según Vescovi y cols. (167) por el hecho de que un estrés psicológico va acompañado por un incremento en ACTH y β -endorfina mientras que en el estrés físico se produce elevación también en los niveles de cortisol.

A nivel del contenido de ácido ascórbico en linfocitos y neutrófilos vemos que se produce una disminución, sobre todo en los linfocitos. Es posible que una mayor intensidad de entrenamiento provoque una mayor producción de radicales libres que, como se sabe, tiene lugar de por sí con el ejercicio (87,90) por lo que la eliminación de dichos radicales para proteger las células del daño oxidativo, produciría una disminución de los niveles de antioxidantes endógenos.

Este hecho también se ha apreciado en los resultados obtenidos en ratones sometidos a ejercicio físico (118), aunque es aquí más evidente dado que el ácido ascórbico es una vitamina para el hombre, que al no poder sintetizarla depende de su ingesta para recuperar los niveles que son utilizados.

Por tanto y a la vista de los resultados parece evidente la necesidad de que los programas de entrenamiento de deportistas de alto rendimiento sean rigurosamente estudiados y continuamente controlados, ya que pueden proporcionar importantes ventajas en la realización deportiva. Si esto no es así, los deportistas podrían llegar a sufrir el denominado "síndrome de sobreentrenamiento" (2,4,174) caracterizado por el hecho de que el deportista entra en un estado de fatiga generalizada del que tiene problemas para recuperarse. El gran problema de este sobreentrenamiento es que, cuando la preparación o entrenamiento no ha sido programado adecuadamente, puede coincidir con campeonatos o pruebas deportivas importantes para las cuales el deportista se ha estado preparando, no obteniéndose los resultados esperados. Desde el punto de vista del SI este sobreentrenamiento es fácilmente detectable puesto que tiene lugar una importante inmunosupresión asociada prácticamente a todos los parámetros que se han estudiado en este trabajo.

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos del estudio llevado a cabo, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- 1.- En general, los deportistas de élite presentan una cierta inmunosupresión en cuanto a la capacidad de proliferación de los linfocitos y a ciertas etapas del proceso fagocítico de PMNs neutrófilos de sangre periférica. A nivel hormonal se observa un aumento de los niveles basales de cortisol y una disminución en los de ACTH, no produciéndose cambios en los niveles de β -endorfina. Presentan una gran variabilidad en cuanto a los niveles intracelulares de antioxidantes endógenos.

Por su parte los individuos que realizan ejercicio de forma moderada o bien no presentan modificaciones en cuanto a su estado inmunológico comparado con el de individuos sedentarios, o bien en algunos parámetros muestran una estimulación funcional de las mismas..

2.- El aumento de la intensidad de entrenamiento, a largo plazo y realizado de forma progresiva y controlada, induce una cierta estimulación de la respuesta inmune, aunque vaya acompañado de un mayor estrés psicológico, lo que indicaría que el deportista no tiene peligro de padecer el síndrome de sobreentrenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen las ayudas recibidas del Consejo Superior de Deportes, durante los años 1991,1992 y 1993, que han permitido la realización de este trabajo.

6. REFERENCIAS

1. FITZGERALD L. Exercise and the immune system. Immunol. Today 1988, 9: 337-339.
2. FITZGERALD L. Overtraining increases the susceptibility to infection. Int. J. Sports Med. 1991,12: S5-S8.
3. PEDERSEN B.K. Exercise and Immunity- Mechanisms of action. Med. Sports Sci. 1992, 37: 33-39.
4. SHARP N.C.C. y KOUTEDAKIS Y. Sport and the overtraining syndrome: immunological aspects. British Med. Bull. 1992, 48: 518-533.
5. MACKINNON L.T. y TOMASI T.B. Immunology of exercise. Ann. Sports Med. 1986, 3: 1-4.
6. PEDERSEN B.K. Influence of physical activity on the cellular immune system: Mechanisms of action. Int. J. Sports Med. 1991, 12: 23-29.
7. SIMON M.B. The immunology of exercise. J. Am. Med. Assoc. 1984, 252: 2735-2738.
8. NIEMAN D.C. y NEHLSSEN- CANNARELLA S.L. The effects of acute and chronic exercise on immunoglobulins. Sports Med. 1991, 11: 183- 201.
9. THARP G.D. y PREUSS T.L. Mitogenic response of T-lymphocyte to exercise training and stress. J. Appl. Physiol. 1991, 70: 2535-2538.
10. BARRIGA C.; CAMPILLO J.E. y ORTEGA E. Aspectos inmunológicos de la actividad física. En: Fisiología de la actividad física y del deporte. Interamericana. McGraw-Hill, 1992, pp 161-174.
11. PEDERSEN B.K., TVEDE N., CHRISTENSEN L.D., KLARLUND K., KRAGBAK S. y HALKJOER-KRISTENSEN J. Natural Killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. Int. J. Sports Med. 1989, 10: 129-131.

12. HACK V., STROBEL G., RAU J.-P. y WEICKER H. The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes in highly trained athletes in a moderate training period. Eur. J. Appl. Physiol. 1992, 65: 520-524.
13. CANNON J.G. Exercise and resistance to infection. J. Appl. Physiol. 1993, 74: 973-981.
14. HEDFORS E., HOLM G. y ÖHNELL B. Variations of blood lymphocytes during work studied by cell surface markers, DNA synthesis and cytotoxicity. Clin. Exp. Immunol. 1976, 24: 328-335.
15. ESKOLA J., RUUSKANEN O., SOPPI E., VILJANEN M.K., JÄRVINEN M., TOIVONEN H. y KOUVALAINEN K. Effect of sport stress on lymphocyte transformation and antibody formation. Clin. Exp. Immunol. 1978, 32: 339-345.
16. EDWARDS A.J., BACON T.H., ELMS C.A., VERARDI R., FELDER M. y KNIGHT S. Changes in the population of lymphoid cells in human peripheral blood following physical exercise. Clin. Exp. Immunol. 1984, 58: 420-427.
17. KEAST D., CAMERON K. y MORTON A.R. . Exercise and the immune response. Sports Med. 1988, 5: 248-267.
18. TVEDE N., PEDERSEN B.K., HANSEN F.R., BENDIX T., CHRISTENSEN L.D., GALBO H. y HALKJOER-KRISTENSEN J. Effect of physical exercise on blood mononuclear cell subpopulation and in vitro proliferative responses. Scand. J. Immunol. 1988, 29: 383-389.
19. VERDE T.J., THOMAS S.G., MOORE R.W., SHEK P. y SHEPHARD R.J. Immune responses and increased training of the elite athlete. Am. Physiological Soc. 1992
20. FRY R.W., MORTON A.R., CRAWFORD G.M.M. y KEAST D. Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocytes subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. Eur. J. Appl. Physiol. 1992a, 64: 218-227.
21. FRY R.W., MORTON A.R. y KEAST D. Acute intensive interval training and T-lymphocyte function. Med. Sci. Sports Exerc. 1992b, 24: 339-345.
22. FERRY A., WEILL B.L. y RIEU M. Immunomodulations induced in rats by exercise on a treadmill. J. Appl. Physiol. 1990, 69: 1912-1915.
23. FERRY A., RIEU P., LAZIRI F., GUEZENNEC C.Y., ELHABAZI A., LE PAGE C. y RIEU M. Immunomodulations of thymocytes and splenocytes in trained rats. Am. Physiological Soc. 1991a.
24. FERRY A., WEILL B., AMIRIDIS I., LAZIRI F. y RIEU M. Splenic immunomodulation with swimming-induced stress in rats. Immunol. Lett. 1991b, 29: 261-264.
25. FERRY A., RIEU P., LAZIRI F., ELHABAZI A., LE PAGE C. y RIEU M. Effect of moderate exercise on rat T-cell. Eur. J. Appl. Physiol. 1992, 65: 464-468.

26. FERRY A., RIEU P., LE PAGE C., ELHABAZI A., LAZIRI F. y RIEU M. Effect of physical exhaustion and glucocorticoids (dexamethasone) on T-cells of trained rats. Eur. J. Appl. Physiol. 1993, 66: 455-460.
27. LEWICKI R., TCHORZEWSKI H., DENYS A., KOWALSKA M. y GOLINSKA A. Effects of physical exercise on some parameters of immunity in conditioned sportsmen. Int. J. Sports Med. 1987, 8: 309-314.
28. UHLENBRUCK G. y ORDER U. Can endurance sports stimulate immune mechanisms against cancer and metastasis? Int. J. Sports Med. 1991, 12: 1-7.
29. HEDFORS E., HOLM G., IVANSEN M. y WAHREN J. Physiological variation of blood lymphocyte reactivity: T-cell subsets, immunoglobulin production, and mixed lymphocyte reactivity. Clin. Immunol. Immunopathol. 1983, 27: 9-14.
30. MACKINNON L.T. y JENKINS D.G. Decreased salivary immunoglobulins after intense interval exercise before and after training. Med. Sci. Sports Exerc. 1993, 25: 678-683.
31. MACKINNON L.T., GINN E. y SEYMOUR G.J.. Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. Eur. J. Appl. Physiol. 1993, 67: 180-184.
32. SMITH J.A., TELFORD R.D., MASON I.B. y WEIDEMANN M.J. Exercise training and neutrophil microbicidal activity. Sports Med. 1990, 11: 179-187.
33. CANNON J.G., ORENCOLE S.F., FIELDING R.A., MEYDANI M., MEYDANI S.N., FIATARONE M.A., BLUMBERG J.B. y EVANS W.J. Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. Am. J. Physiol. 1990, 259: R1214-R1219.
34. CANNON J.G., MEYDANI S.N., FIELDING R.A., FIATARONE M.A., FARHANGMEHR M., ORENCOLE S.F., BLUMBERG J.B. y EVANS W.J. Acute phase response in exercise II. Associations between vitamin E, cytokines and muscle proteolysis. Am. J. Physiol. 1991, 260: 1235-1240.
35. NORTHOFF H. y BERG A. Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. Int. J. Sports Med. 1991, 12: 9-15.
36. ORTEGA E., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. Study of the phagocytic process in neutrophils from elite spottswomen. Eur. J. Appl. Physiol. 1993c, 66: 37-42.
37. ORTEGA E., COLLAZOS M.E., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. Stimulation of the phagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. Eur. J. Appl. Physiol. 1992, 64: 323-327.
38. ORTEGA E., COLLAZOS M.E., MAYNAR M., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. Stimulation of the phagocytic function of neutrophils in sedentary men after acute moderate exercise. Eur. J. Appl. Physiol. 1993, 66: 60-64.
39. ORTEGA E., FORNER M.A., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. Effect of age and of swimming-induced stress on the phagocytic capacity of peritoneal macrophages from mice. Mech. Ageing Develop. 1993, 70: 53-63.

40. TILZ G.P., DOMEJ W., DIEZ-RUIZ A., WEISS G., BREZINSCHKE R., BREZINSCHKE H.P., HÜTTL E., PRISTAUTZ H., WACHTER H. y FUCHS D. Increased immune activation during and after physical exercise. Immunobiol. 1993, 188: 194-202.
41. BORER K.T., BESTERVELT L.L., MANNHEIM M., BROSAMER M.B., THOMPSON M., SWAMY U. y PIPER W.N. Stimulation by voluntary exercise of adrenal glucocorticoid secretion in mature female hamsters. Physiol. & Behav. 1992, 51: 713-718.
42. STUPNICKI R. y OBMINSKI Z. Glucocorticoid response to exercise as measured by serum and salivary cortisol. Eur. J. Appl. Physiol. 1992, 65: 546-549.
43. VIRU A. Plasma hormones and physical exercise. Int. J. Sports Med. 1992, 13: 201-209.
44. SNEGOVSKAYA V. y VIRU A. Elevation of cortisol and GH levels in the course of further improvement of performance capacity in trained rowers. Int. J. Sports Med. 1993, 14: 202-206.
45. ELIAS A.N., IYER K., PANDIAN M.R., WEATHERSBEE P., STONE S. y TOBIS J. β -endorphin/ β -lipotropin release and gonadotropin secretion after acute exercise in normal males. J. Appl. Physiol. 1986, 61: 2045-2049.
46. ELIAS A.N., FAIRSHTER R., PANDIAN M.R., DOMURAT E. y KAYALEH R. β -endorphin/ β -lipotropin release and gonadotropin secretion after acute exercise in physically conditioned males. Eur. J. Appl. Physiol. 1989, 58: 522-527.
47. TENDZEGOLSKIS Z., VIRU A. y ORLOVA E. Exercise-induced changes of endorphin contents in hypothalamus, hypophysis, adrenals and blood plasma. Int. J. Sports Med. 1991, 12: 495-497.
48. CANNON J.G. y KLUGER M.J. Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. Science 1983, 220: 617-619.
49. CANNON J.G., EVANS W.J., HUGHES V.A., MEREDITH C.N. y DINARELLO C.A. Physiological mechanisms contributing to increased IL-1 secretion. J. Appl. Physiol. 1986, 61: 1869-1874.
50. CANNON J.G., FIELDING R.A., FIATARONE M.A., ORENCOLE S.F., DINARELLO C.A. y EVANS W.J. Increased interleukin 1β in human skeletal muscle after exercise. Am. J. Physiol. 1989, 257: 451-455.
51. HARDY L. Psychological stress, performance, and injury in sport. British Med. Bull. 1992, 48: 615-629.
52. SALIT M. Exercise and immunity. En: Drugs, athletes and physical performance. 1988
53. LEWIS T. The blood vessels of the human skin and their responses. Shaw and sons. 1927 London.

54. SELYE H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. Brain J. Exp. Pathol. 1936, 17: 234-238.
55. SELYE H. The evolution of stress concept. Am. Scient. 1973, 61: 692-699.
56. BESEDOVSKY H., SORKIN E., FELIX D. y HAAS H. Hypothalamic changes during the immune response. Eur. J. Immunol. 1977, 7: 323-325.
57. BLALOCK J.E. The immune system as a sensory organ. J. Immunol. 1984, 132: 85.
58. BLALOCK J.E. Production of neuroendocrine peptide hormones by the Immune System. Prog. Allergy 1988, 43: 1-13.
59. BLALOCK J.E. Neuroimmunoendocrinol. Chem. Immunol. 1992, 52: 26-45.
60. FELTEN S. y FELTEN D. Innervation of lymphoid tissue. En: R. Ader, D.L. Felten, y N. Cohen (eds.). Psychoneuroimmunology. 1991, San Diego, CA. Academic Press. 2nd ed. 27.
61. WEIGENT D.A. y BLALOCK J.E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. Immunological Rev. 1987. Munksgaard, Copenhagen.77.
62. COVELLI V., JIRILLO E. y ANTONACI S. Neuroimmune networks and aging of the immune of the immune system: biological and clinical significance. Arch. Gerontol. Geriatr. 1992, S3: 129.
63. BESEDOVSKY H.O. y DEL REY A. Physiological implications of the immune-neuroendocrine network. En: R. Ader, D.L. Felten, y N. Cohen (eds.). Psychoneuroimmunology. 1991, San Diego, CA. Academic Press. 2nd ed. 589-608.
64. HOMO-DELARCHE F. y DARDENNE M. The neuroendocrine-immune axis. Springer Seminars Immunopathol. 1993, 14: 221-238.
65. ADER R. y COHEN N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. Annu. Rev. Psychol. 1993, 44: 53-85.
66. HANDZEL Z.T. Y BUCHNER V.C. Stress and the Immune Response. En: Spierer Z., Roifman C.M., Branski D. (ed.): Pediatric Immunology Pediatr. Adolesc. 1993, Med. Basel, Karger, 3: 210-221.
67. CUPPS T.R. y FAUCI A.S. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. Immunol. Rev. 1982, 65: 133-155.
68. MUNCK A., GUYRE P.M., HOLBROOK N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocrine Rev. 1984, 5: 25-44.
69. STERNBERG E.M. y PARKER C.W. Pharmacologic aspects of lymphocyte regulation. En: Marchalonis J.J. (ed). En: The lymphocyte: Structure and Function. 1988, New York: Marcel Dekker, Inc: 1-54.

70. STERNBERG E.M., WILDER R.L., GOLD P.W. y CHROUSOS G.P. A defect in the central component of the immune system-hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback loop is associated with susceptibility to experimental arthritis and other inflammatory diseases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990, 594: 289-292.
71. STERNBERG E.M., CHROUSOS G.P., WILDER R.L. y GOLD P.W. The stress response and the regulation of inflammatory disease. Ann. Int. Med. 1992, 117: 854-866.
72. SCHLEIMER R.P. Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. Am. Rev. Respir. Dis. 1990, 141: 559-69.
73. SCHLEIMER R.P., FREELAND H.S., PETERS S.P., BROWN K.E. y DERSE C.P. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1989, 250: 598-605.
74. CATANIA A., MANFREDI M.G., AIRAGHI I., VIVIRITO M.C. MILAZZO F. y ZANUSSI C. Evidence for impairment of the immune-adrenal circuit in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Horm. Metab. Res. 1990, 22: 597-598.
75. SAYDER D.S. y UNANUE E.R. Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and Il-1 production. J. Immunol. 1982, 129: 1803-1805.
76. GUYRE P.M. Y MUNK A. Glucocorticoid actions on monocytes and macrophages. En: Antiinflammatory steroid action, basic and clinical aspects. 1989, Academic Press. 9: 199-225.
77. MANSO G., BAKER A.J., TAYLOR I.K., FÜLLER R.W. In vivo and in vitro effects of glucocorticosteroids on arachidonic acid metabolism and monocyte function in nonasthmatic humans. Eur. Respir. 1992, J.5: 712-716.
78. GOULDING N.S. Y GUYRE P.M. *Glucocorticoids, lipocortin and the immune response.* Current Opinion in Immunology 1993, 5: 108-113.
79. UEHAR A. A., GILLIS S., ARIMURA A. Effect of interleukin-1 on hormone release from normal rat pituitary cells in primary culture. Neuroendocrinology 1987, 45: 343-347.
80. CAMBRONERO J.C., RIVAS F.J., BORRELL J., GUAZA C. Interleukin-2 induces corticotropin-releasing hormone release from perfused rat hypothalamus: influence of glucocorticoids. Endocrinology 1992b, 131: 677-683.
81. GUAZA C., BORRELL J. Prostaglandins and CRF release from invitro perfused rat hypothalamus by interleukins. Effects of dexamethasone treatment. Eur. J. Neuroscience Suppl. 1993, 6 pg 254.
82. DE SOUZA E.B. ; WEBSTER E.L. y GRIGORIADIS D.E. Corticotropin-releasing factor and IL-1 receptors in the brain-pituitary-immune axis. Psychopharmacol. Bull. 1989, 25: 299-305.

83. CAMBRONERO J.C., RIVAS F.J., BORRELL J., GUAZA C. Interleukin-1 β induces pituitary adrenocorticotropin secretion: evidence for glucocorticoid modulation. Neuroendocrinology 1992a, 55: 648-654.
84. BETANCUR C., LLEDO A., BORRELL J., GUAZA C. Corticosteroid regulation of IL-1 receptors in the mouse hippocampus: effects of glucocorticoid treatment, stress, and adrenalectomy. Neuroendocrinology 1994, 59: 120-128.
85. HAYFLICK L. The cell biology of human aging. Sci. Amer. 1980, 242: 58-65.
86. FITZGERALD L. Exercise in the elderly. Med. Clin. North Am. 1985, 69: 189-196.
87. SJÖDIN B., HELLSTEN-WESTIN Y. y APPLE F.S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med. 1990, 10: 236-254.
88. CAMPILLO J.E., MAYNAR M., MARCOS J.F. y MENA P. Envejecimiento y actividad física. En: Fisiología de la actividad física y del deporte. 1992, Interamericana. McGraw-Hill, 357-366.
89. DILLARD C.J., LITOV R.E., SAVIN W.M. y TAPPEL A.L. Effects of exercise, vitamin E and ozone in pulmonary function and lipid peroxidation. J. Appl. Physiol. 1978, 45: 927-932.
90. DAVIES K.J.A., QINTAHILHA A.T., BROOKS G.A. y PACKER L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1982, 107: 1198-1205.
91. ALESSIO H.M., GOLDFARB A.H. y CUTLER R.C. MDA contents increases in fast- and down-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. Am. J. Physiol. 1988, 255: C874-C877.
92. ALESSIO H.M. y GOLDFARB A.H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise. Adaptative response to training. J. Appl. Physiol. 1988, 64: 1333-1336.
93. ALESSIO H.M. Exercise-induced oxidative stress. Med. Sci. Sports Exerc. 1993,25: 218-224.
94. GUTTERIDGE J.M.C. Lipid peroxidation: some problems and concepts. En: Oxygen Radicals and Tissue Injury, Halliwell B. (Eds.), 1988, Bethesda, MD: Upjohn Symposium, 9-19.
95. JENKINS R.R. Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Med. 1988 , 5: 156-170.
96. JI L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. Med. Sci. Sports Exerc. 1993, 25: 225-231.
97. JENKINS R.R., FRIEDLAND R. y HOWALD H. The relationship of oxygen consumption to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. Int. J. Sports Med. 1984, 4: 11-14.

98. KISHORCHANDRA G., ROTHFUSS G.L., LANG J. y PACKER L. Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content. J. Appl. Physiol. 1987, 63: 1638-1641.
99. JI L.L., STRATMAN F.W. y LARDY H.A. Enzymatic down regulation with exercise in rat skeletal muscle. Arch. Biochem. Biophys. 1988, 263: 137-149.
100. FREI B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. Am. J. Clin. Nutr. 1991, 54: 1113S-1118S.
101. DiMASCIO P., MURPHY M.E. y SIES H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherol and thiols. Am. J. Clin. Nutr. 1991, 53: 194S-200S.
102. SIES H. y MURPHY M.E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1991, 8: 211-224.
103. BALL S.S., WEINDRUCH R. y WALDFORD R.L. Antioxidants and the immune response. En: Johnson Jr J.E., Waldford R., Harman D., Miquel J. (Eds.). Free radicals, Aging, and Degenerative Diseases. 1986, Liss, New York, 427-456.
104. BENDICH A. Interaction between antioxidant vitamins C and E and their effect on immune responses. En: Miquel J., Quintanilha A.T., Weber H. (Eds.). Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine II. 1989, Florida: CRC Press, 153-160.
105. HARDIE L.J., FLETCHER T.C. y SECOMBES C.J. The effect of vitamin E on the immune response of the atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 1990, 87: 211-224.
106. SHARMANOV A.T., AIDARKHANOV B.B. y KURMANGALINOV S.M. Effect of vitamin E deficiency on oxidative metabolism and antioxidant enzyme activity of macrophages. Ann. Nutr. Metab. 1990, 34: 143-146.
107. TURNER R.J. y FINCH J.M. Immunological malfunctions associated with low selenium-vitamin E diets in lambs. J. Comp. Pathol. 1990, 102: 99-109.
108. MORIGUCHI S., KOBAYASHI N. y KISHINO Y. High dietary intakes of vitamin E and cellular immune functions in rats. J. Nutr. 1990, 120: 1096-1102.
109. JENSEN M., FOSSUM C., EDEROTH M. y HAKKARAINEN R.V.J. The effect of vitamin E on the cell-mediated immune response in pigs. J. Vet. Med. 1988, B. 35: 549-555.
110. TENDERDY R.P. The role of vitamin E in immune response and disease resistance. Ann. NY Acad. Sci. 1990, 587: 24-33.
111. GENSLER H.L. y MAGDALENO M. Topical vitamin E inhibition of immunosuppression and tumorigenesis induced by ultraviolet irradiation. J. Cancer 1991, 15: 97-106.
112. MEYDANI S.N. Dietary modulation of the immune response in the aged. Age 1991, 14: 108-115.

113. SAKAMOTO W., FUJIE K., NISHIHIRA J., MINO M. y MUROTA S.I. Inhibition of PGE2 production in macrophages from vitamin E-treated rats. Prostag. Leukotr. 1991, Ess. 44: 89-92.
114. AFONINA G.B. y BORDONOS V.G. Role of free-radical oxidation of lymphocyte membrane lipids in the development of immunodeficiency and its correction by alpha-tocopherol. Immunologiya 1990, 5: 33-35.
115. HERNANZ A., COLLAZOS M.E. y DE LA FUENTE M. Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophage from mice and guinea pigs during phagocytosis. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1990, 91: 166-170.
116. RODRIGUEZ A.B., HERNANZ A. y DE LA FUENTE M. Effect of three β -lactam antibiotics on ascorbate content, phagocytic activity and superoxide anion production in human neutrophils. Cell Physiol. Biochem. 1990, 1: 170-176.
117. KENNES B., DUMONT I., BROHEE D., HUBERT C. y NEVE P. Effect of vitamin C supplements on cell-mediated immunity in old people. Gerontol. 1983, 29: 305-310.
118. DE LA FUENTE M., FERRANDEZ M.D., MIQUEL J. y HERNANZ A. Changes with aging and physical exercise in ascorbic acid content and proliferative response of murine lymphocytes. Mech. Ageing Develop. 1992, 65: 177-186.
119. SAUBERLICH H.E. Vitamin C status: methods and findings. Ann. NY Acad. Sci. 1975, 258: 438-449.
120. LEE W., HAMERMYLK P., HUTCHINSON M., RAISYS V.A. y LABLE R.F. Ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid chromatographic assay. Clin. Chem. 1982, 28: 2165-2169.
121. EVANS R.M., CURRIE L., y CAMPELL A. The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood in normal individuals, and its relation to the plasma concentration. Br. J. Nutr. 1982, 47: 473-482.
122. YONEMOTO R.H. Vitamin C and immune responses in normal controls and cancer patients. Int. J. Vit. Nutr. Res. 1979, 19: 143-154.
123. THOMAS W. y HOLTZ P. Vitamin C and immunity: an assessment of the evidence. Clin. Exp. Immunol. 1978, 32: 370-379.
124. WASHKO P., ROSTROSEN D. y LEVINE M. Ascorbic acid in human neutrophils. Am. J. Clin. Nutr. 1991, 54: 1221S-1229S.
125. FREI B. y AMES B.N. Ascorbic acid protects plasma lipids against oxidative damage. Nutr. Cancer 1991, 15: 250-251.
126. HEMILÄ H. Vitamin C and the common cold. British J. Nutr. 1992, 67: 3-16.
127. TAPPEL A.L. Vitamin E: a biological antioxidant. Vit. Horm. 1962, 20: 493-510.

128. DE LA FUENTE M., MARTIN M.I. y ORTEGA E. Changes in the phagocytic function of peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 1990, 13: 189-198.
129. MEYDANI S.N., MEYDANI M. y BLUMBERG J.B. Antioxidants and the aging immune response. Adv. Exp. Med. Biol. 1990, 262: 57-67.
130. BÖYUM A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968, 21: 77-82.
131. MCGREGOR R., SPAGNOULO P. y LENTNEK A. Inhibition of granulocyte adherence by ethanol, prednisone and aspirin, measured with a new assay system. New Engl. J. Med. 1974, 291: 642.
132. RODRIGUEZ A.B., PARIENTE J.A., PRIETO P. y BARRIGA C. Effects of cefmetazol, cefoxitin, and Imipenem on polymorphonuclear leukocytes. Gen. Pharmacol. 1987, 18: 613.
133. BOYDEN S.V. The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 1962, 115: 453-456.
134. FONTAN G., LLORENTE F., GARCIA RODRIGUEZ M. y OJEDA J. Defective neutrophil chemotaxis and hyperimmunoglobulinemia E. Acta Paediatr. Scand. 1976, 65: 509.
135. DE LA FUENTE M. Changes in the macrophage function with aging. Comp. Biochem. Physiol. 1985, 81A: 935-938.
136. BAGASRA O., HOWEEDY A. y KAJDASCY-BALLA A. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. Modulation of surface receptors and phagocytosis. Immunology 1988, 65: 405-409.
137. NUÑEZ R.M., RODRIGUEZ A.B., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. In vitro and in vivo effects of Imipenem on phagocytic activity of peritoneal macrophages. APMIS 1989, 97: 879-886.
138. HERNANZ A. High-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in serum using paired-ion chromatography and UV spectrophotometric detection. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1988, 26: 459-461.
139. SHEARER M.J. HPLC of small molecules. A practical approach. Ed. C. K. LIM. 1986, Irl. Press Oxford.
140. FLOHE L. y OTTING F. Superoxide dismutase assays. Meth. Enzymol. 1984, 105: 93-104.
141. ESTERBAUER H., LANG J., ZADRAVEC S. y SLATER T.F. Detection of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. Meth. Enzymol. 1984, 105: 319-328.
142. HEATH R.L. y PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. Arch. Biochem. Biophys. 1968, 125: 189-192.

143. CAREN L.D. Effects of exercise on the human immune system. Does exercise influence susceptibility to infections?. Bio. Sci. 1991, 41: 410-414.
144. KHANSARI D., MURGO A.J. y FAITH R.E. Effects of stress on the immune system. Immunol. Today 1990, 11: 170-175.
145. McCARTHY D.A. y DALE M.M. The leucocytosis of exercise. A review and model. Sports Med. 1988, 6: 333-363.
146. ROBERTSON A.J., RAMESAR K.C.R.B., POTTS R.C., GIBBS J.H., BROWNING M.C.K., BROWN R.A., HAYES P.C. y BECK J.S. The effect of strenuous physical exercise on circulating blood lymphocytes and serum cortisol levels. J. Clin. Lab. Immunol. 1981, 5: 53-57.
147. CHRISTIANSEN R.D. y HILL H.R. Exercise-induced changes in the blood concentration of leukocyte populations in teenage athletes. Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 1987, 9: 140-142.
148. HANSEN J.B., WILSCARD L.I. y OSTENOL B. Biphasic changes in leukocyte induced by strenuous. Eur. J. Appl. Physiol. 1991, 62: 157.
149. BUSSE W.W., ANDERSON C.L. HANSON P.G. The effect of exercise on the granulocyte response to isoproterenol in the training athlete and unconditioned individuals. J. Allergy Clin. Immunol. 1980, 65: 358.
150. BRODDE O.E., ANTON D. y O'HARA N. β -adrenoceptor changes in human lymphocytes, induced by dynamic exercise. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1984, 325: 190-192.
151. HOLMQVIST N., SECHER N.H., SANDER-JENSEN K., KNIGGE U., WARBERG J. y SCHWARTZ T.W. Sympathoadrenal and parasympathetic responses to exercise. J. Sport Sci. 1986, 4: 123-128.
152. CRARY B., HAUSER S.L., BORYSENKO M., KUTZ I., HOBAN C., AULT K.A., WEINER H.L. y BENSON H. Epinephrine-induced changes in the distribution of lymphocyte subsets in peripheral blood of humans. J. Immunol. 1983, 131: 1178-1181.
153. MASUHARA M., KAMI K., UMEBAYASI K. y TATSUMI N. Influences of exercise on leukocyte count and size. J. Sports Med. 1987, 27: 285-290.
154. RODRIGUEZ A.B., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. Phagocytic function of blood neutrophils in sedentary young people after physical exercise. Int J. Sports Med. 1991b, 12: 276-280.
155. NEHLSSEN-CANNARELLA S.L., NIEMAN D.C., JESSEN J., CHANG L., GUSEWITCH G., BLIX G.G. y ASHLEY E. The effects of acute moderate exercise on lymphocyte function and serum immunoglobulin levels. Int. J. Sports Med. 1991b, 4: 391-398.
156. NIEMAN D.C., NEHLSSEN-CANNARELLA S.L., DONOHUE K.M., CHRITTON D.B.W., HADDOCK B.L., STOUT R.W. y LEE J.W. The effects of acute moderate exercise on leukocyte and lymphocyte subpopulations. Med. Sci. Sports Exerc. 1990, 23: 578-585.

157. MACKINNON L.T. y TOMASI T.B. Immunology of exercise. En: Sports Medicine. Fitness. Training. Injuries. Urban y Schwarzenberg (Eds.), 1988, Baltimore, MD, 273-289.
158. PEDERSEN B.K., TVEDE N., HANSEN F.R., ANDERSEN V., BENDIX T., BENDIXEN G., BENDTZEN K., GALBO H., HAAHR P.M., KLARLUND K. y otros. Modulation of natural killer cell activity in peripheral blood by physical exercise. Scand. J. Immunol. 1988, 27: 673-678.
159. HOFFMAN-GOETZ L. y PEDERSEN B.K. Exercise and the immune response: a model of the stress response? Immunology Today 1994, 15: 382-387.
160. PEDERSEN B.T. y ULLUM H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. Med. Sci. Sports Exerc. 1994, 26: 140-146.
161. HERBERT T.B. y COHEN S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. Psychosomatic Med. 1993, 55: 364-379.
162. WALLER K.V. Effects of stress on the immune system. Clin. Lab. Sci. 1989, 2: 213-214.
163. WALLER K.V. Effects of short-term exercise on immunologic tests. Clin. Lab. Sci. 1991, 4: 175-180.
164. BIDZINSKA B., PETRAGLIA F., ANGIONI S., GENEZZANI A.D., CRISCUOLO M., FICARRA G., GALLINELLI A., TRENTINI G.P. y GENAZZANI A.R. Acetyl-L-carnitine effect on pituitary and plasma β -endorphin responsiveness to different chronic intermittent stressors. J. Neuroendocrinology 1993, 5: 151-155.
165. WATANABE T., MORIMOTO A., SAKATA Y., TAN N., MORIMOTO K. y MURAKAMI N. Running training attenuates the ACTH responses in rats to swimming and cage-switch stress. J. Appl. Physiol. 1992, 73: 2452-2456.
166. KANALAY J.A., BOILEAY R.A., BAHR J.M., MISNER J.E. y NELSON R.A. Cortisol levels during prolonged exercise: the influence of menstrual phase and menstrual status. Int. J. Sports Med. 1992, 13: 332-336.
167. VESCOVI P.P., MICHELINI M., MANINETTI L., PEDRAZZONI M., PIOLI G. y PASSERI M. Short time cold exposure and plasma levels of β -endorphin, ACTH, GH, PRL and cortisol in human subjects. Neuroendocrinol. Lett. 1993, 15: 243-254.
168. TEGELMAN R., ABERG T., POUSETTE A. y CARLSTRÖM K. Effects of a diet regimen on pituitary and steroids hormones in male ice hockey players. Int. J. Sports Med. 1992, 13: 424-430.
169. GABRIEL H., SCHWARZ L., STEFFENS G. y KINDERMANN W. Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. Int. J. Sports Med. 1992, 13: 359-366.

170. NIEMAN D.C., BERK L.S., SIMPSON-WESTERBERG M., ARABATZIS K., YOUNGBERG S., TAN S.A., LEE J.N. y EBY W.C. Effects of long-endurance running on immune system parameters and lymphocyte function in experienced marathoners. Sports Med. 1989a, 10: 317-323.

171. DAVIES K.J.A., PACKER L. y BROOKS G.A. Biochemical adaptation of mitochondria, muscle and whole-animal respiration to endurance training. Arch. Biochem. Biophys. 1981, 209: 539-554.

172. BLOMQVIST C.G. y COYLE B. Cardiovascular adaptations to physical training. Annu. Rev. Physiol. 1983, 45: 169-189.

173. SURKINA I.D. Stress and immunity among athletes. Soviet Sports Rev. 1982, 17:198-202.

174. KUIPERS H. y KEIZER H.A. Overtraining in elite athletes. Sports Med. 1988, 6: 79-92.

NORMAS DE PRESENTACIÓN PARA LA ADMISIÓN DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN¹

1. Los trabajos breves o sumarios de investigación que se presenten para su eventual publicación por el Consejo Superior de Deportes (C.S.D.) deberán tener una extensión de 30 a 40 páginas (DIN-A-4, espaciado interlineal 1'5). Se recomienda seguir el esquema general de trabajos de investigación:
 - a) Introducción que exponga los fundamentos del trabajo y especifique claramente sus objetivos.
 - b) Descripción de las fuentes, métodos, materiales y equipos empleados en su realización.
 - c) Exposición de los resultados y discusión de los mismos.
 - d) Conclusiones finales.

Deberá figurar con toda claridad:

- **Título completo del trabajo en castellano y su versión inglesa;** y si se desea, también en francés.
 - **Iniciales del nombre y apellidos de los autores.**
 - **Resúmenes del contenido, en castellano y en inglés,** y si se desea, también en francés, de un mínimo de 100 y un máximo de 250 palabras, acompañados de las **palabras clave** que definan el contenido del trabajo (6 a 10, preferentemente extraídos del texto del trabajo).
 - **Notas al pie de página o final del texto:** Se acompañarán en anexo al final del texto, debidamente numeradas, indicándose en el texto el lugar al que hace referencia cada nota.
 - **Referencias bibliográficas** de obras citadas en el texto.
 - **Ilustraciones :** Según el tipo de ilustraciones que acompañen el trabajo (tablas, gráficas, fotografías, etc.), deben entregarse en la forma y en el soporte más apropiado para garantizar una óptima reproducción, así como en forma de copia o fotocopia impresa, en anexo al texto, debidamente numerados y acompañados del título o leyenda correspondiente. En el texto se indicará el lugar en el que, en principio, debería insertarse cada ilustración.
2. Indicación de ayudas percibidas por el C.S.D.: se indicarán el tipo y los años de ayuda percibida.
 3. **Datos de los autores.** Los textos que se presenten para su publicación deben ir firmados por sus autores y acompañados de los datos completos de la institución o centro, dirección completa y teléfono de contacto de los mismos. Deberán enviar sus trabajos a la sede del Centro de Alto Rendimiento y de Investigación en Ciencias del Deporte (CARICD), acompañados de una fotografía del autor y un breve curriculum relacionado con la obra (máximo 10 líneas).
 4. **Soportes de presentación.** El trabajo deberá entregarse en papel DIN-A-4, por duplicado, con espacio interlineal de 1,5, en lengua castellana, y en disquete, grabado en un fichero con procesador de textos para MS-DOS: Word para Windows (versión NO superior a 8.0), Wordperfect (versión NO superior a 6.1), o ASCII, **sin códigos de formato del procesador de texto.**

¹ Extracto de la «Normativa General para la presentación de Trabajos» del Centro Nacional de Investigación y Ciencias del Deporte (CNICD).

5. Los perceptores de ayudas del C.S.D. que presenten sumarios de investigación de acuerdo con los requisitos y condiciones establecidos para su publicación por el Consejo Superior de Deportes (a través del Centro de Alto Rendimiento y de Investigación en Ciencias del Deporte) cederán **por escrito** todos los derechos de autor y de reproducción del trabajo en cualquier tipo de soporte (incluidas microformas o bases de datos informatizadas) al C.S.D. y harán constar la aceptación de las presentes normas, haciendo uso del modelo establecido para el efecto.
6. Asimismo los autores asumirán expresamente el compromiso de realizar las modificaciones y correcciones necesarias en el caso de aprobarse la publicación, lo que se comunicará por escrito a los mismos.
7. El C.S.D. se reserva el derecho de publicación de los sumarios presentados, así como de su resumen, en el medio y momento que considere oportunos, en el marco de su programa editorial.
8. El C.S.D. remitirá a los autores cinco ejemplares de la publicación para su libre disposición.
9. En el caso de no publicarse el trabajo o sumario presentado en el plazo de dos años, el autor podrá solicitar del C.S.D. la devolución de los textos y materiales originales, quedando una copia en el CARICD.
10. **Tratamiento automatizado de los datos.** A los efectos previstos en el artículo 5 de la Ley Orgánica 5/1992, de Regulación del Tratamiento Automatizado de los datos de carácter personal, los datos que se soliciten a los autores de trabajos a publicar por el C.S.D. podrán ser objeto de tratamiento automatizado. La responsabilidad del fichero automatizado corresponde al Centro de Alto Rendimiento y de Investigación en Ciencias del Deporte del Consejo Superior de Deportes.

La admisión-aceptación de estos trabajos no implica obligatoriamente su publicación que, en cualquier caso, se decidirá por la Comisión de Investigación creada al efecto.

El C.S.D. no asumirá necesariamente las opiniones expresadas por los autores en los trabajos y sumarios de investigación que publique.

El Centro de Alto Rendimiento y de Investigación en Ciencias del Deporte no se compromete a publicar trabajos que no reúnan los requisitos y normas marcados, ni su publicación supone que comparta las opiniones en ellos expresadas.

Nota: Estas normas se basan en normas ISO y normas UNE. Puede solicitarse su versión interina ampliada, así como el modelo oficial de cesión de derechos y aceptación de las bases, a:

CENTRO DE ALTO RENDIMIENTO Y DE
INVESTIGACION EN CIENCIAS DEL DEPORTE
Unidad: Publicaciones
C/ del Greco s/n
28040 Madrid
Tel.: (91) 589.68.77; 589.05.27/28
Fax.: (91) 544.81.22
Email: csd.publicaciones@csd.mec.es

Colección:

ESTUDIOS SOBRE CIENCIAS DEL DEPORTE

- 1.- Análisis biomecánico de los lanzamientos en atletismo
- 2.- Adaptación hormonal e inmunológica al entrenamiento
- 3.- Indicadores para la detección de talentos deportivos
- 4.- Estructura ocupacional y mercado laboral en el deporte
- 5.- Patrocinio, comunicación y deporte I: la comercialización del deporte en una sociedad mediática
- 6.- Patrocinio, comunicación y deporte II: publicidad y patrocinio en eventos deportivos
- 7.- Los deportistas olímpicos españoles: un perfil sociológico (análisis sociológico de los participantes en los juegos olímpicos celebrados en el periodo 1980-1992)
- 8.- Métodos de estudio de composición corporal en deportistas
- 9.- Valores sociales y deporte: fair play versus violencia
- 10.- Educación física y práctica docente
- 11.- El deporte en las universidades españolas: análisis de la encuesta realizada por el consejo superior de deportes sobre el deporte y su organización, práctica y equipamientos en las universidades
- 12.- Análisis biomecánica de las técnicas deportivas: salto de altura, lanzamientos de jabalina, y carrera de velocistas ciegos
- 13.- Rendimiento deportivo: parámetros electromiográficos (EMG), cinemáticos y fisiológicos
- 14.- Nuevas perspectivas didácticas y educativas de la educación física
- 15.- Experiencias de formación de docentes y entrenadores en el ámbito de la actividad física y el deporte
- 16.- Investigación epistemológica. el campo disciplinar en educación física
- 17.- Control del dopaje: aspectos analíticos de los esteroides anabolizantes
- 18.- Ejercicio y estrés: aspectos celulares y moleculares
- 19.- Tecnología deportiva: control del rendimiento de los deportistas y de las instalaciones
- 20.- Política y violencia en el fútbol
- 21.- Biomecánica de la fuerza muscular y su valoración. análisis cinético de la marcha, natación, gimnasia rítmica, bádminton y ejercicios de musculación
- 22.- El apoyo biomecánico al rendimiento deportivo. lanzamiento atlético, carreras, relevos, natación, tenis y tiro.
- 23.- Efectos e implicaciones de variables fisiológicas sobre el entrenamiento
- 24.- Participación deportiva: perspectiva ambiental y organizacional
- 25.- Nacimiento e implantación de la Educación Física en España: los tiempos modernos
- 26.- Rendimiento deportivo en altitud
- 27.- Aplicación de nuevas tecnologías en medicina deportiva
- 28.- Mejora del proceso enseñanza-aprendizaje en educación física
- 29.- Estudios sobre el deporte y el medio ambiente
- 30.- Mujer y deporte. Las mujeres en la alta competición deportiva



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN,
CULTURA Y DEPORTE



PVP: 5,63 € I.V.A. incluido

ISBN 84-7949-110-8



9 788479 491109