

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA
Consejo Superior de Deportes

EJERCICIO Y ESTRÉS

*Aspectos celulares
y moleculares*

18

INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DEL DEPORTE

icd

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA
Consejo Superior de Deportes

EJERCICIO Y ESTRÉS

*Aspectos celulares
y moleculares*

18

icd

SERIE ICd DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DEL DEPORTE

La Serie ICd, de Investigación en Ciencias del Deporte, es una publicación del Consejo Superior de Deportes que pretende satisfacer la demanda de información científica especializada, difundiendo los trabajos que, por su calidad, actualidad y rigor científico, difundiendo los trabajos que, por su calidad, actualidad y rigor científico, pueden ser de interés para los especialistas.

Los trabajos que se publican en ICd son seleccionados por un Comité Científico, están sujetos a la «Normativa General para la presentación de trabajos» del Programa de publicaciones del Consejo Superior de Deportes y, en la mayoría de los casos, son producto de las becas y ayudas a la investigación que concede el C.S.D.

“Los artículos publicados en la serie ICD se encuentran referenciados 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 nueva base de datos se encuentra en el CD-ROM de Silver Platter junto a SPORTDISCUS y HERACLES y también puede consultarse a través de Internet: (<http://www.uida.es/basedatos/atlantis.html>)”.

Director Editorial:

José Luis Hernández Vázquez

Coordinación Editorial:

Miguel Angel Gutiérrez Medina

Consultores Científicos:

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

Edita:

Ministerio de Educación y Cultura
Consejo Superior de Deportes
© 1998

Edición no venal.

N.I.P.O.: 663-09-022-x

Depósito Legal: M-14322-2009

Distribución e información:

Centro Nacional de Investigación
y Ciencias del Deporte
C/ del Greco s/n Tl. 91/589 05 50
28040 Madrid Fax 91/544 81 22
Web: <http://www.mec.es/csd>
e-mail: secinfo.dep@csd.mec.es

Venta:

Librería del B.O.E.
C/ Trafalgar, 29 Tel. 91/538 22 95
28071 Madrid Fax 91/538 22 67

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

EJERCICIO Y ESTRÉS:

Aspectos celulares y moleculares

Inducción de la síntesis de proteínas de estrés en fibras musculares y en células hepáticas tras ejercicio agudo

Hernando, R.; González, B.; Delicado, M.^a L.; Manso, R.

Efecto de los esteroides anabólico-androgénicos decanoato de nandrolona y estanozolol sobre la actividad del eje hipotálamo hipofisario-gonadal y la función linfocitaria

Hernando, R.; Ferrández, M.^a D.; Fuente, M. de la; Díaz, A.E. y Manso, R.

Cambios en la respuesta inmune por el estrés asociado al ejercicio físico

Fuente, M. de la; Maya, A.; Rífo, M. del; Ferrández, D.

Estudio de mediadores hormonales en la estimulación de la respuesta inmune inespecífica de macrófagos inducida por el ejercicio intenso

Ortega E.; Rodríguez A.B. y Barriga C.

ICd NÚM. 18

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA
Consejo Superior de Deportes

ÍNDICE

EJERCICIO Y ESTRÉS: Aspectos celulares y moleculares

	<u>Pág.</u>
Presentación	9
I. INDUCCIÓN DE LA SINTESIS DE PROTEINAS DE ESTRES EN FIBRAS MUSCULARES Y EN CELULAS HEPATICAS TRAS EJERCICO AGUDO	11
1. Introducción	
1.1. El ejercicio físico y la respuesta simpática de estrés	15
1.2. Proteínas de choque térmico y chaperones moleculares	16
1.3. El ejercicio físico y la respuesta celular de estrés	17
1.4. Objetivos	17
2. Materiales y métodos	18
2.1. Animales de experimentación y protocolo de ejercicio	18
2.2. Evaluación de la síntesis de proteínas de estrés en cortes de tejido	19
2.3. Separación de proteínas mediante electroforesis mono y bidimensional	19
2.4. Cuantificación de la síntesis y acumulación de proteínas de estrés	20
2.5. Descripción de anticuerpos	21
2.6. Análisis estadístico	21
3. Resultados	21
3.1. Proteínas de estrés en músculo esquelético e hígado	21
3.2. Inducción de la síntesis de proteínas de estrés en músculos sóleo y EDL y en hígado después de ejercicio agudo	24
3.3. Acumulación de proteínas de estrés tras ejercicio agudo en músculos soleo y EDL y en hígado	26
4. Discusión	31
4.1. Conclusiones	36
5. Agradecimientos	37
6. Bibliografía	37
II. EFECTO DE LOS ESTEROIDES ANABOLICO-ANDROGENICOS DECANOATO DE NANDROLONA Y ESTANOZOLOL SOBRE LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTALAMO HIPOFISARIO-GONADAL Y LA FUNCIÓN LINFOCITARIA	39
1. Introducción y objetivos	43

2. Materiales y métodos	45
2.1. Sistema experimental	45
2.2. Tratamientos y programas de entrenamiento	47
2.3. Extracción y preparación de los tejidos	47
2.4. Ensayos de funcionalidad de los linfocitos	47
2.5. Análisis estadístico	48
3. Resultados	48
3.1. Efecto de los entrenamientos y del tratamiento con esteroides anabólico-androgénicos sobre el peso corporal y otros parámetros indicativos de efectos biológicos inducidos por ambos factores	48
3.2. Efectos de la administración de esteroides anabolizantes en individuos sedentarios y entrenados sobre los niveles séricos de testosterona y de enzimas marcadoras de la integridad hepatocelular	50
3.3. Efecto de la aplicación de dos programas de entrenamiento de intensidad diferente y de la administración de EAAs sobre la movilidad espontánea e inducida de linfocitos de timo y bazo ...	52
3.4. Efectos de la aplicación de dos programas diferentes de entrenamiento en cinta rodante y de la administración por separado de dos EAAs sobre la respuesta proliferativa basal y la inducida por la concanavalina A, de linfocitos de timo y bazo	54
4. Discusión	57
5. Conclusiones finales	59
6. Agradecimientos	60
7. Bibliografía	60

III. CAMBIOS EN LA RESPUESTA INMUNE POR EL ESTRES ASOCIADO AL EJERCICIO FÍSICO. 65

1. Introducción	69
1.1. Efecto del ejercicio físico en el sistema inmune	69
1.2. Estrés y sistema inmune	71
1.2.1. Aspectos Neuroinmunoendocrinos del estrés	72
1.2.2. Modelos experimentales de estrés: El ejercicio físico	72
1.2.3. Efectos del estrés en el sistema inmune	73
2. Materiales y metodos	74
2.1. Material biológico	74
2.2. Programa de entrenamiento físico	74
2.3. Obtención de las muestras biológicas	75
2.3.1. Obtención de suero	75
2.3.2. Obtención de macrófagos peritoneales	75
2.3.3. Obtención de linfocitos de bazo, timo y ganglios axilares	76
2.4. Estudio de la función fagocítica	76

2.4.1. Movilidad dirigida o Quimiotaxis	76
2.4.2. Fagocitosis de partículas de latex	76
2.4.3. Test de Reducción del Nitroazul de Tetrazolio	76
2.5. Estudio de la función Linfoide	77
2.5.1. Respuesta Proliferativa de linfocitos	77
2.6. Determinación de corticosterona en sueros	77
2.7. Estudio estadístico	77
3. Resultados	78
3.1. Peso corporal y peso relativo de organos	78
3.2. Cuantificación de macrófagos y linfocitos	78
3.3. Niveles sericos de corticosterona	79
3.4. Función fagocítica de macrófagos peritoneales	80
3.4.1. Quimiotaxis	80
3.4.2. Fagocitosis	81
3.4.3. Reducción del NBT	82
3.5. Función linfoide	82
3.5.1. Quimiotaxis	82
3.5.2. Capacidad de proliferación de linfocitos de organos inmunocompetentes	83
3.5.2.a. Proliferación Espontánea	83
3.5.2.b. Linfoproliferación en respuesta a mitógeno (Con A)	83
4. Discusión	84
4.1. Efecto de la actividad física en los niveles de corticosterona	84
4.2. Efecto de la actividad física, como modelo de estres, en el peso y numero de celulas de los organos inmunocompetentes	85
4.3. Efecto de la actividad física como modelo de estres, en el proceso fagocítico de la macrófagos peritoneales	87
4.4. Efecto de la actividad física como modelo de estres, en la función linfoide	89
4.5. Discusión general	91
5. Agradecimientos	92
6. Bibliografía	92

IV. ESTUDIO DE MEDIADORES HORMONALES EN LA ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA DE MACRÓFAGOS INDUCIDA POR EL EJERCICIO INTENSO	99
1. Introducción	103
1.1. Introducción al estudio del sistema inmune	103
1.2. Ejercicio y sistema inmune	105
1.3. Influencia de algunas hormonas sobre el sistema inmune. Relación con el ejercicio	105
2. Material y metodos	106
2.1. Animales	106

	<u>Pág.</u>
2.2. Actividad física	106
2.3. Plasma	107
2.4. Obtención de macrófagos peritoneales	107
2.5. Estudio de fagocitosis	107
2.6. Estudio de la capacidad microbicida	107
2.7. Tratamiento de macrófagos peritoneales con plasma procedente de los animales sometidos a ejercicio sobre la fagocitosis y la destrucción de las partículas inertes por los macrófagos peritoneales	108
2.8. Valoración de la concentración de hormonas	108
2.9. Tratamiento de los macrófagos peritoneales con las diferentes "hormonas de estrés" sobre la capacidad fagocítica y la capacidad microbicida oxígeno-dependiente de los macrófagos peritoneales	108
2.10. Análisis estadístico	109
3. Resultados	109
3.1. Efecto del ejercicio intenso (natación hasta el agotamiento) sobre la fagocitosis y la destrucción de las partículas inertes	109
3.2. Efecto del plasma procedente de los ratones sometidos a ejercicio sobre la fagocitosis y destrucción de las bolas de latex por los macrófagos peritoneales	110
3.3. Concentraciones plasmáticas de corticosterona, prolactina, triyodotironina (T3) y tirosina (T4)	111
3.4. Influencia de la corticosterona, prolactina y hormonas tiroideas sobre la fagocitosis y destrucción de las partículas inertes	113
4. Discusión	116
5. Bibliografía	118

Presentación

A pesar de la idea, cada vez más extendida, de que el ejercicio físico es beneficioso para la salud, se plantean algunas paradojas que no han sido resueltas todavía y que obligan a introducir cautelas en la aplicación general de esta aseveración.

Así, aunque el ejercicio altera la distribución y tráfico de células mononucleares periféricas, y generalmente mejora la función inmune, el entrenamiento excesivo puede originar disfunciones que conducen a un aumento en la susceptibilidad a las infecciones y que suelen conocerse como "síndrome del sobreentrenamiento". Un segundo aspecto paradójico se refiere a la relación entre el ejercicio y los efectos tóxicos del oxígeno, ya que *el ejercicio incrementa considerablemente el consumo de oxígeno y la producción de radicales libres centrados en este átomo*, a los que se supone asociados al envejecimiento y a un cierto número de patologías. Aunque aún no se ha establecido una relación causal entre la realización de ejercicio y la manifestación de estrés oxidativo, tras la realización de ejercicio agudo se han observado aumentos en los niveles de diversos productos resultantes de la peroxidación lipídica, incluyendo hidroperóxidos lipídicos, aldehído malónico, sustancias reactantes con ácido tiobarbitúrico, etano y pentano. Aunque en los animales o humanos sin entrenar la producción de radicales libres generados por el ejercicio pudiera exceder la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante, ocasionando estrés oxidativo y daño tisular, el entrenamiento físico es capaz de regular los sistemas de defensa antioxidante proporcionando *protección adicional a las células*.

El interés científico actual en los radicales libres trasciende más allá de lo relacionado con sus aparentes efectos patológicos. El oxígeno ha significado un importante impulso promotor de cambios evolutivos y no parece desatinado pensar que el oxígeno o algún producto derivado de él pudiera seguir actuando como estímulo promotor de la acomodación a cambios en el consumo celular de oxígeno. El músculo esquelético, por ejemplo, responde al entrenamiento aeróbico con un incremento en la capacidad respiratoria que es consecuencia del aumento en el número de mitocondrias. Aunque todavía no se conoce el estímulo promotor de la proliferación mitocondrial, se ha sugerido que puede proceder de los radicales libres generados en exceso en el tejido muscular por el mayor consumo de oxígeno y la disminución en la eficiencia del transporte electrónico que puede provocar el incremento de la temperatura muscular.

El estrés térmico y el estrés oxidativo son solamente dos ejemplos de un amplio número de situaciones de estrés frente a las que todas las células estudiadas hasta la fecha son capaces de responder de una manera predecible. La respuesta consiste en la inducción de la síntesis de una serie amplia de proteínas, a las que se conoce como proteínas de choque térmico o de estrés (HSPs), cuya función parece relacionarse con la protección de los daños inducidos por el estrés y la defensa para afrontarlo con éxito en situaciones futuras. Este proceso se conoce como respuesta celular de estrés, para diferenciarlo de la respuesta simpática de estrés, caracterizada por una serie de cambios neuroendocrinos que resultan de la activación que sufre el hipotálamo por el estrés. Sin embargo, existen evidencias experimentales de que entre ambos procesos pudiera existir una relación causa-efecto.

El sistema inmune y los sistemas celulares de respuesta al estrés presentan ciertas analogías. Ambos sistemas parecen haberse desarrollado para garantizar la supervivencia del individuo frente a las agresiones del entorno y ambos sistemas parecen modularse por el estrés y, por ello, responden al ejercicio físico. Precisamente esta característica común de respuesta al estrés, es la que se ha tomado como línea directriz para la organización de este volumen titulado "Ejercicio y estrés: Aspectos celulares y moleculares". En él se incluyen trabajos que de forma directa o indirecta tratan la cuestión que se suscita al comienzo de esta presentación sobre los límites del paradigma del deporte y la salud, y se ofrece un abordaje experimental para aproximarse a la naturaleza de la señal inducida por el ejercicio que es capaz de desencadenar el proceso de adaptación muscular, utilizando modelos experimentales animales. El sistema endocrino tiene aquí un importante papel modulador de la respuesta del sistema inmune por el ejercicio y, posiblemente también, de la respuesta celular de estrés. Con respecto a este último aspecto, la hipótesis que se plantea de que la respuesta celular de estrés pudiera ser un paso trascendental para la adaptación al entrenamiento y no solamente una consecuencia negativa de la agresión producida por algún factor generado por el ejercicio, ofrece una nueva vía para el estudio de los mecanismos que determinan la especificidad y selectividad de las respuestas adaptativas. Si resultara, como parece probable, que esto es así, podríamos haber encontrado un grupo de marcadores muy sensibles de la respuesta al ejercicio y de la adaptación al entrenamiento.

RAFAEL MANSO
Universidad Autónoma de Madrid

INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS EN FIBRAS MUSCULARES Y EN CÉLULAS HEPÁTICAS TRAS EJERCICIO AGUDO

*Hernando, R.
González, B.
Delicado, M.^a L.
Manso, R.*

Departamento de Biología Molecular,
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM),
Universidad Autónoma de Madrid.

Dirección para correspondencia:

Rafael Manso,
Departamento de Biología Molecular,
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa",
Universidad Autónoma de Madrid, Canto Blanco, 28049-Madrid.
Tel. 91 3974871
Fax: 91 3974799
E-mail: Rmanso@cbm.uam.es



Raquel Hernando Sebastián: es Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid. Se encuentra en la actualidad en la fase de redacción de su tesis doctoral que ha dedicado al estudio de 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).



Beatriz González Alonso: es Graduada en Ciencias Biológicas y está realizando su tesis doctoral sobre los mecanismos de inducción de la respuesta de estrés tras el ejercicio en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), en la Universidad Autónoma de Madrid.



María Luz Delicado Escudero: es Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Alcalá de Henares y realiza su tesina de licenciatura sobre el efecto de los cambios en la actividad contráctil muscular sobre la expresión de isoformas de las subunidades de miosina y la fosforilación de las cadenas ligeras reguladoras, en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM) en la Universidad Autónoma de 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, en la que es actualmente Prof. 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 (actual CNICD) y miembro del Comité de Expertos en Investigación en Materia Deportiva del Consejo de Europa entre 1988 y 1990. Dirige en la actualidad un grupo de investigación dedicado al estudio de los mecanismos moleculares de adaptación al entrenamiento en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), en la Universidad Autónoma de Madrid.

Resumen: Un gran número de trabajos aparecidos en los últimos años han llamado la atención de los investigadores sobre las denominadas proteínas de choque térmico o estrés (HSPs), un grupo de proteínas agrupadas en familias de características próximas cuya síntesis se incrementa considerablemente en situaciones comprometidas para la célula. A estas proteínas se atribuyen funciones esenciales que incluyen la participación en

el plegamiento correcto de las proteínas, su translocación a diferentes compartimentos y su organización en agregados supramoleculares, protegiendo a las células de las agresiones del entorno y preparándolas para superar nuevas situaciones de estrés. Durante el ejercicio se alteran numerosos parámetros fisiológicos (incluyendo la temperatura, pH, concentraciones iónicas, disponibilidad de nutrientes y oxígeno, etc.) lo que puede ser percibido por las células de diversos tejidos como una situación de estrés de la que debe defenderse el organismo para mantener la homeostasis. En este trabajo se presentan los resultados de un estudio dirigido a caracterizar la respuesta de estrés en las fibras del músculo esquelético y en células hepáticas, analizando las cinéticas de inducción y de acumulación de las proteínas de estrés de la familia de 70 kDa y otras HSPs abundantes en mamífero. Para obtener información sobre el posible agente estresante que actúa como inductor primario de la respuesta de estrés al ejercicio en las células musculares y tratar de establecer su posible relación con la respuesta de estrés en hígado, se han estudiado en paralelo dos músculos que difieren en sus características metabólicas y contráctiles y en el grado de implicación en el ejercicio: el músculo sóleo, formado en casi su totalidad por fibras de contracción lenta y muy activo durante el ejercicio, y el extensor de los dedos largos (EDL), formado casi exclusivamente por fibras rápidas y escasamente implicado en la actividad locomotriz durante la carrera de intensidad moderada en tapiz rodante. Las velocidades relativas de síntesis (referidas a la proteína de expresión constitutiva HSP73) de las diferentes HSPs se analizaron tras separación de los componentes individuales marcados radiactivamente (por incubación de cortes de tejido con ³⁵S-metionina) mediante electroforesis bidimensional. Gran parte de las proteínas de estrés estudiadas aumentaron considerablemente su velocidad de síntesis después del ejercicio, tanto en el músculo sóleo como en el EDL, alcanzando valores máximos poco después de finalizar la carrera y retornando a los valores de reposo en unas 5-6 h. La cinética de síntesis de proteínas de estrés en el hígado es similar a la observada en músculo. Los niveles de la proteína de estrés inducible HSP72, la más sensible a situaciones de estrés en células de mamífero, aumentó solamente de forma transitoria en el periodo de postejercicio en el músculo EDL pero su acumulación en el músculo sóleo fué más continua y estable. Esta diferencia cinética en la acumulación de proteína entre el sóleo y el EDL se repite para otras proteínas de estrés como la GRP75 y la HSP90. La proteína constitutiva HSP73 aumentó de forma transitoria en ambos músculos pero no en hígado. Las diferentes proteínas de estrés presentan niveles basales muy diferentes en diversos órganos e incluso en diferentes tipos de fibras. Así, la proteína HSP72 es mucho más abundante en el músculo sóleo que en el EDL u otros tejidos y la GRP78 es mucho más abundante en hígado. La HSP73, sin embargo, presenta niveles relativamente constantes en diferentes órganos. Aunque la respuesta de estrés al ejercicio en el hígado tiene, en general, características similares a las del músculo esquelético, el comportamiento cinético de la proteína GRP78 fué peculiar ya que su síntesis se induce de forma retardada. Considerados en su conjunto, los resultados que se presentan ponen de manifiesto que la respuesta celular de estrés del músculo esquelético al ejercicio agudo no se induce por la actividad contráctil muscular, sino que el agente inductor debe ser producido y/o distribuido por todo el organismo. No obstante, parecen existir mecanismos dependientes de la actividad contráctil que hacen que los niveles de proteínas de estrés aumenten solamente en los músculos activos. Este comportamiento podría responder a una estrategia evolutiva de anticipación para prevenir las graves consecuencias que los daños en el músculo esquelético pueden tener para la supervivencia del individuo.

Palabras clave: Proteínas de choque térmico o de estrés, ejercicio, músculo esquelético, hígado, ratas Wistar.

Abstract: Heat-shock or stress proteins (HSPs) are thought to play an essential role in protecting cells from stress and preparing them to survive new environmental challenges. Induction of stress protein synthesis is an early event in the physiological response to exercise. We report here the results of an investigation on the kinetics of synthesis and accumulation of 70 kDa stress proteins in two different skeletal muscle types and in the liver, to obtain information concerning the exercise-induced signal responsible for promoting the skeletal muscle stress response. The rates of synthesis of 70 kDa heat-shock proteins were greatly enhanced after a single exercise-bout in both the active soleus and in the scarcely implicated extensor digitorum longus muscle. They peaked early in the post-exercise hours and returned to resting levels after approximately 5-6 h. Kinetics of stress protein synthesis in the liver was similar to that of skeletal muscle, with the notable exception of GRP78, a very prominent protein in the liver. The constitutive expression levels of the stress protein HSP72 in the soleus muscle were much higher than in other skeletal muscle types and other tissues, while those of HSP73 were relatively constant among tissues. HSP72 levels in the soleus muscle increased almost linearly during the first post-exercise hours. However, the levels of this protein in the less active EDL muscle increased only transiently following exercise, as also occurred with hsp 73 levels in both muscle types. The kinetic differences in the accumulation of HSP72 in both muscles were also extended to GRP75 and HSP90, indicating that an effective accumulation of stress proteins does only occur in active muscles. Taken together, these data indicate that the skeletal muscle stress response to exercise is not induced by muscle contractile activity itself but involves a factor produced and/or distributed by the whole organism. However, there are apparently contractile activity-dependent mechanisms that enable an effective accumulation of stress proteins in contracting muscles.

Key words: Heat-shock proteins, hsp 70 isoforms, hsp 72 phosphorylation, skeletal muscle, exercise, Wistar rats.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El ejercicio físico y la respuesta simpática de estrés

Como respuesta a una situación de estrés, en los mamíferos se inducen una serie de cambios neuroendocrinos que conducen a la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (con producción de esteroides corticales) y del sistema nervioso simpático (que conduce a la producción de catecolaminas). Ambos sistemas de respuesta al estrés interaccionan funcionalmente en el cerebro, el lóbulo anterior de la hipófisis, la glándula adrenal y los vasos sanguíneos periféricos, lo que tiene como resultado un incremento de la actividad cardiovascular que amplifica la homeostasis. El ejercicio físico es uno de los estímulos inductores de la respuesta fisiológica de estrés. Modificando su intensidad y duración se pueden obtener respuestas graduales predecibles, lo que lo hace un buen candidato para el estudio de las alteraciones inducidas por el estrés. La respuesta del organismo al ejercicio implica cambios fisiológicos profundos.

A pesar de la idea, cada vez más extendida, de que cualquier tipo de ejercicio físico es beneficioso para la salud, se han obtenido datos experimentales que plantean ciertas paradojas que no han sido resueltas todavía y que obligan a introducir cautelas en la aplicación general de esta aseveración. Así, aunque el ejercicio altera la distribución y tráfico de células mononucleares periféricas y, generalmente mejora la función inmune, el entrenamiento intenso puede originar disfunciones que conducen a un aumento en la susceptibilidad a las infecciones. Un segundo aspecto paradójico se refiere a la relación entre el ejercicio y los efectos tóxicos del oxígeno, ya que el ejercicio incrementa considerablemente el consumo de oxígeno y la producción de radicales libres centrados en este átomo a los que se supone asociados al envejecimiento y a un cierto número de patologías. Aunque aún no se ha establecido una relación causal entre la realización de ejercicio y la manifestación de estrés oxidativo, tras la realización de ejercicio agudo se han observado aumentos en los niveles de diversos productos resultantes de la peroxidación lipídica, incluyendo hidroperóxidos lipídicos, aldehído malónico, sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS), etano y pentano. Aunque en los animales o humanos sin entrenar la producción de radicales libres generados por el ejercicio pudiera exceder la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante, dando lugar a daños tisulares, el entrenamiento físico parece capaz de regular los sistemas de defensa antioxidante proporcionando protección adicional contra un incremento en la producción de radicales libres.

El interés científico actual en la importancia de los radicales libres trasciende a sus pretendidos efectos patológicos. El oxígeno ha significado un importante impulso promotor de cambios evolutivos y no parece desatinado pensar que algunos productos derivados de él pudieran seguir actuando como estímulos promotores de la acomodación a cambios en las exigencias energéticas. Aunque el estímulo que induce la proliferación mitocondrial durante el entrenamiento de resistencia aeróbica todavía no es conocido, se ha sugerido que puede proceder del incremento en la producción de radicales libres que se asocia al mayor consumo de oxígeno y a la disminución en la eficiencia del transporte electrónico provocado por el incremento de la temperatura muscular. El estrés oxidativo y la hipertermia son sola-

mente dos de los posibles tipos de agresiones a que pueden verse sometidas las células musculares durante la realización de ejercicio. La acidificación, resultante de la actividad glucolítica, la hipoxia, la deficiencia de glucosa, la elevación de niveles de iones, particularmente el calcio y el estrés mecánico, constituyen factores adicionales de perturbación del equilibrio celular que pueden inducirse como consecuencia del ejercicio físico. Las células de diferentes tejidos disponen de mecanismos para percibir estas señales e inducir respuestas defensivas que garanticen la supervivencia celular.

1.2 Proteínas de choque térmico y chaperones moleculares

Todas las células estudiadas hasta la fecha, desde el más sencillo de los procariontes a las células de las especies más complejas, inducen la síntesis de una serie de proteínas, conocidas como proteínas de choque térmico o de estrés, cuando se someten a la acción de una gran diversidad de situaciones agresivas. Por haberse caracterizado esta respuesta tras aumentos en la temperatura, la denominación de proteínas de choque térmico (heat-shock proteins, HSP) ha prevalecido, aunque resulta más adecuada la denominación de proteínas de estrés para hacer referencia a la gran diversidad de situaciones agresivas que inducen esta respuesta celular. El hecho de que la respuesta de estrés sea común a todos los sistemas biológicos estudiados sugiere que las proteínas de estrés son fundamentales, bien para responder al estrés, bien como mecanismo de supervivencia celular tras el estrés. Además, algunas de estas proteínas o proteínas relacionadas se expresan de forma constitutiva en altos niveles, por lo que se les atribuyen funciones esenciales para la actividad celular normal. Pueden interactuar con otras proteínas para contribuir al correcto plegamiento proteico, su estabilización, su translocación en el interior celular y su organización en agregados supramoleculares. Numerosas, aunque no todas las proteínas de estrés actúan como chaperones moleculares (término que hace referencia a su capacidad de interactuar con otras proteínas que no están en su conformación nativa) y, viceversa, algunos chaperones moleculares son proteínas constitutivas cuyos niveles no se modifican considerablemente en respuesta a situaciones de estrés. Por ello, se suele hacer referencia a este grupo de familias proteicas como proteínas de estrés y chaperones moleculares. La participación de estas proteínas en el plegamiento proteico se puso de manifiesto en estudios sobre la importación de proteínas en la mitocondria, lo que ocurre con todas las proteínas que están codificadas por genes nucleares. Tras su síntesis en el citosol las proteínas precursoras atraviesan las membranas mitocondriales en una conformación desplegada. Cuando la cadena polipeptídica alcanza la matriz mitocondrial, se estabiliza uniéndose al componente mitocondrial de la familia de proteínas de estrés de 70 kDaltons (denominada GRP75, por proteína regulada por glucosa de 75 kdaltons). Posteriormente, la proteína se une a la HSP60, otra proteína de estrés localizada en el interior mitocondrial que forma parte de una familia de proteínas de unos 60 kDa (a cuyos miembros se conocen con el nombre de chaperoninas) que, en unión de un cofactor (otra proteína de estrés de pequeño tamaño, la HSP10), parece formar una estructura adecuada para el correcto plegamiento de la proteína. La entrada de proteínas al retículo endoplásmico implica a otro miembro de la familia de proteínas de estrés de 70 kdaltons, la GRP78. Las proteínas HSP70 y HSP90 participan en la translocación del

receptor de glucocorticoides desde el citosol al núcleo, lo que constituye un punto de convergencia entre la respuesta endocrina al estrés y la actividad de estas proteínas. En los mamíferos las proteínas de respuesta celular al estrés que más se inducen son los componentes de la familia de proteínas de estrés de 70 kDa, un grupo de proteínas relacionadas en el que se incluyen HSP72, HSP73, GRP75 y GRP78. Todas ellas tienen la capacidad común de interactuar con ATP pero tienen diferente localización subcelular. HSP72 y HSP73 se localizan en el citosol y en el núcleo. La HSP73 se expresa de forma constitutiva (sin requerir exposición a situaciones de estrés) a niveles relativamente altos mientras que la HSP72 suele inducirse mucho en situaciones de estrés. La GRP78 se encuentra en la luz del retículo endoplásmico en donde tiene ciertos niveles basales que se incrementan por situaciones que producen estrés en este compartimento. La GRP75, se localiza en la mitocondria, en donde participa en la tranlocación de precursores de proteínas mitocondriales, interactuando con la HSP60 y otras HSPs para facilitar el plegamiento y la oligomerización de complejos proteicos. La expresión constitutiva de las diferentes proteínas de estrés es diferente en los diversos tejidos e incluso en diferentes células dentro de un mismo tejido, lo que indica que estas proteínas realizan funciones esenciales específicas.

1.3 El ejercicio físico y la respuesta celular de estrés

El ejercicio físico es capaz de inducir la síntesis incrementada de proteínas de estrés, lo que ha sido puesto de manifiesto inicialmente en células de bazo, linfocitos periféricos y músculo sóleo de ratas macho, y en diversos músculos de las patas traseras, miocardio e hígado, en ratas hembra. Una de las hipótesis iniciales sugería una relación entre la subida de la temperatura y el aumento del estrés oxidativo tisular y la inducción de la respuesta celular de estrés tras ejercicio, basándose en datos comparativos de las proteínas de estrés inducidas en cada una de estas situaciones. Al elevar la temperatura del medio de incubación de los músculos a 42 °C, o exponerlos a la presencia de especies reactivas de oxígeno (generadas con el sistema xantina-xantina oxidasa), se incrementa la síntesis de siete de las quince proteínas cuya presencia aumentaba por el ejercicio (no coincidentes) y cinco comunes, quedando una única proteína que no responde ni al estrés oxidativo ni al térmico, lo que sugiere que la acción concertada de ambos factores pudiera justificar en gran medida la respuesta celular inducida por el ejercicio agudo.

A pesar de las evidencias de que el aumento de la temperatura que se produce durante el ejercicio pudiera ser uno de los factores principales en la inducción de la respuesta de estrés, existen evidencias experimentales recientes que indican que el incremento de la HSP70 que se produce como consecuencia del ejercicio físico es independiente de la temperatura corporal, lo que sugiere la participación de otros factores que podrían actuar como inductores de la respuesta celular de estrés al ejercicio físico en el músculo esquelético y otros tejidos.

1.4 Objetivos

El presente trabajo se ha dirigido a caracterizar la respuesta de estrés en las fibras del músculo esquelético y en el hígado, analizando las cinética de inducción y de acu-

mulación de las proteínas de estrés de la familia de 70 kDa y otras HSPs abundantes en mamífero. Para obtener información sobre el posible agente estresante que actúa como inductor primario de la respuesta de estrés al ejercicio en las células musculares y tratar de establecer su posible relación con la respuesta de estrés en hígado, se han estudiado en paralelo dos músculos que difieren en sus características metabólicas y contráctiles y en el grado de implicación en la actividad locomotriz: el músculo sóleo, formado en casi su totalidad por fibras de contracción lenta y muy activo durante el ejercicio, y el extensor de los dedos largos (EDL), formado casi exclusivamente por fibras rápidas y escasamente implicado en la actividad locomotriz durante la carrera de intensidad moderada en tapiz rodante. Utilizando técnicas de electroforesis bidimensional y de cuantificación con ayuda de anticuerpos específicos se pretende localizar las proteínas de estrés más prominentes en diferentes tejidos de la rata y estudiar la inducción de su síntesis y acumulación tras el ejercicio. Adicionalmente, se determinarán comparativamente los niveles basales de expresión de proteínas de estrés en diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas, en miocardio y en otros órganos relevantes para la actividad metabólica durante el ejercicio para obtener una visión de la posible importancia funcional de cada una de ellas en los diferentes tejidos. De los datos resultantes podrán sacarse conclusiones sobre si el agente inductor de la respuesta de estrés muscular, sea éste cual sea, se produce exclusivamente en el músculo como consecuencia de la actividad contráctil o es producido o distribuido por todo el organismo. Además, los resultados se analizarán en relación con los interrogantes sobre la cuestión de si el aumento en los niveles de proteínas de estrés es solamente una consecuencia negativa de la situación de estrés a que se ven sometidas las células o constituye realmente un paso fundamental para que se produzca el proceso adaptativo.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Animales de experimentación y protocolo de ejercicio

Se utilizaron como animales de experimentación ratas Wistar de 4-5 meses de edad en el momento del sacrificio. Los animales se criaron en el Centro de Biología Molecular, donde se mantuvieron en un ambiente de temperatura (22-24°C) y humedad relativa (50-60%) controladas, con un ciclo circadiano de L/O 12:12. Se alimentaron con una dieta de comida estandar para rata (A-0,4 PanLab) y agua "ad libitum". Los animales se entrenaron en un tapiz rodante (Li 8706 Letica Scientific Instruments). Antes de comenzar los experimentos los animales se sometieron a un periodo de preentrenamiento (5 días, 10-20 min./día) para permitir que se familiarizaran con el tapiz rodante.

El ejercicio agudo consistió en 60 min. de carrera en el tapiz rodante a una velocidad de 22 m/min. durante los primeros 10 min. y de 27 m/min. los 50 min. restantes. Se hicieron cuatro grupos de animales que se anestesiaron y sacrificaron a distintos intervalos de tiempo tras el ejercicio: 0h (inmediatamente después de finalizar el ejercicio) y 1h, 2h y 4h post-ejercicio. Un grupo de animales familiarizado previamente con el tapiz rodante se utilizó como grupo control. Todas las intervenciones se hicieron siguiendo las recomendaciones que se indican en la "Guía de cuidados y uso de animales de laboratorio" (Departamento de Salud y Servicios Humanos, Institutos Nacionales de la Salud, USA) así como en las normas europeas sobre protección de los animales.

2.2 Evaluación de la síntesis de proteínas de estrés en cortes de tejido

Tras el ejercicio los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal (200µl/100g de peso corporal) de una solución de 40mg/ml de quetamina (Ketolar, Parke-Davis) y 5mg/ml de xilacina (Rompun, Bayer) y se extrajeron rápidamente los músculos EDL y sóleo de las patas traseras y el hígado (tras realizar una perfusión hepática con solución salina para eliminar la sangre). Para determinar los niveles de síntesis de las proteínas de estrés, se prepararon secciones transversales (0.75 mm de espesor) de la zona media de los músculos (cortador de tejidos The Mickel Laboratory Engineering Co. Ltd). En el caso del hígado, para aumentar la superficie de interacción con el medio de cultivo, de un fragmento de tejido se prepararon secciones primarias que se cortaron longitudinal y transversalmente para obtener así cubos de aproximadamente 0.75 mm de lado. Los músculos e hígado no utilizados para la preparación de cortes finos se congelaron inmediatamente después de su extracción en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C hasta su posterior utilización para la determinación de los niveles de proteínas de estrés por cuantificación con ayuda de anticuerpos. Para evaluar la síntesis de las proteínas de estrés se utilizó, con pequeñas variaciones, el método descrito por Locke y cols. Los cortes de tejido se equilibraron durante 30 min. a 37°C con dos cambios de medio mínimo esencial de Dulbecco sin metionina en una estufa con una atmósfera de CO₂ al 5%, y se incuban durante 2h en medio nuevo suplementado con 275µCi/ml de una mezcla de ~70% [³⁵S]metionina y ~30% [³⁵S]cisteína (Amersham). Una vez finalizada la incubación los cortes se lavaron con solución salina fisiológica y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El nivel de síntesis para cada una de las proteínas de estrés se determinó después de someter a flouorografía geles bidimensionales de homogeneizados de proteínas totales. Debido a que los cortes de tejido se mantienen metabólicamente activos durante su equilibrado e incubación (2 h y media), mientras que las muestras utilizadas para determinar los niveles se congelaron inmediatamente después de su extracción, los datos de síntesis no corresponden temporalmente con los de los niveles, por lo que en las gráficas se corrige el tiempo considerando el periodo de incubación, que se indica en la misma mediante una línea discontinua en cuyo centro se sitúan los valores observados.

2.3 Separación de proteínas mediante electroforesis mono y bidimensional

A partir de las muestras congeladas o de los cortes de tejido incubados con metionina radiactiva, de músculo o hígado se prepararon homogeneizados en 19 vol. de CIK 10mM, Tris-CIH 10mM pH 7,6, 2-mercaptoetanol 180 mM, glicerol al 50% y PMSF 1mM. La separación de las proteínas de los homogeneizados totales (80-100 µg de proteína/muestra) se realizó mediante electroforesis desnaturalizante con SDS en geles de polyacrilamida (SDS-PAGE) utilizando concentraciones de acrilamida del 9% o del 12% y 20 % ó un 15% de glicerol, respectivamente. Las electroforesis bidimensionales (2D-EF) se realizaron esencialmente según el método descrito por O'Farrel. Para la preparación de las muestras, las proteínas presentes en los homogeneizados de tejido se precipitaron añadiendo 4 volúmenes de acetona (99,9%, grado HPLC, Sigma-Aldrich), se centrifugó a 10000 x g durante 2 min. y el sedimento se disolvió en una solución de urea 9,8 M (Gibco BRL), dithiotreitol 80mM (Gibco BRL), 2-mercaptoeta-

mol 120mM, Nonidet P40 al 3,2 % y 0,8% de anfolitos pH 3-10 (Pharmalyte, Pharmacia), con una pequeña sonicación. Esta solución se centrifugó 1h a 100.000 x g y 10°C. En cada uno de los geles de isoelectroenfoque (IEF, 1ª dimensión de la electroforesis bidimensional) de 18 cm de longitud y 2,5 mm de diámetro, se aplicaron aproximadamente 200 µg de proteína. En estos geles se generaron gradientes de pH de 4-6,5 utilizando 2,4% de anfolitos de pH 4-6,5 y 0,48% de los de pH 3-10. Estos geles se sometieron a isoelectroenfoque a 800V durante 17,5 horas seguido de 30 min. a 900V, con un amperaje máximo de 0,33 mA/gel. Una vez terminada la primera dimensión, los geles se sacaron y equilibraron durante 10 min. en un tampón con 10 mM Tris/HCL pH 6,8, 2% SDS, 10 mM ditritioleitol y 10% glicerol para posteriormente situarlos horizontalmente sobre en geles en placa de gradientes de pliacrilamida del 9-20%, en los que se realizó la segunda dimensión. Los geles completos o zonas no utilizadas para inmunoreconocimiento se tiñeron con azul de Coomassie (Coomassie brillant Blue R.) al 0,5%.

2.4 Cuantificación de la síntesis y acumulación de proteínas de estrés

La radiactividad incorporada en las HSP se detectó mediante fluorografía de los geles de segunda dimensión siguiendo el método descrito por Chamberlain usando X-Omat AR film (Kodak). Los tiempos de exposición se calcularon considerando la incorporación específica de radiactividad en proteína en los diferentes tipos de músculo e hígado. En el músculo EDL se incorporó un 40% menos que en el sóleo. Para poder comparar las diferentes muestras entre si, corrigiendo las posibles diferencias debidas a la actividad específica de la metionina o a la cantidad de proteína cargada en cada gel, todos los datos se refieren a la incorporación específica de metionina en la proteína de estrés de expresión constitutiva HSP73, que se utiliza como referencia interna. La repetición (n=5) de la determinación de la incorporación relativa de metionina en la misma muestra da los siguientes coeficientes de variación: HSP72, 11%; GRP75, 14%; GRP78, 6%; HSP60, 20%. Cuando se realizan diferentes cortes de tejido de un mismo músculo y se incuban de forma independiente con metionina (n=5) y se realiza todo el proceso anterior los coeficientes de variación que se obtienen son: HSP72, 18% ; GRP75, 19%; GRP78, 16%; HSP60, 27%. Para medir los niveles de expresión de las diferentes HSPs, se separaron las proteínas mediante geles mono- o bidimensionales y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,2 µm, Schleicher & Schüll) siguiendo el método descrito por Towbin y colb. usando una cubeta de transferencia en medio líquido. Las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con rojo Ponceau para visualizar la transferencia y poder localizar las proteínas de referencia. Posteriormente las membranas se bloquearon con 5% de leche desnatada en un tampón salino con Tween 0,1%, se lavaron y se procesaron para el reconocimiento específico de las diferentes proteínas de estrés con anticuerpos monoclonales específicos. El complejo antígeno anticuerpo se reconoció con un anticuerpo secundario (dirigido contra inmunoglobulinas del animal en que se produjo el anticuerpo primario) conjugado con peroxidasa de rábano que se detectó mediante una reacción de quimioluminiscencia amplificada (ECL, Amersham). La cuantificación de la proteína en geles teñidos con azul de coomassie, autoradiografías o películas expuestas a la reacción de quimioluminiscencia se realizó mediante un densitometro láser (Molecular Dynamics, Image Quant Software v.3.0).

2.5 Descripción de anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos comerciales que reconocían a las diferentes proteínas de estrés en estudio. Todos los anticuerpos se preparaban en tampón TBS conteniendo albúmina al 0,1% y timerosal 0,1% para evitar el crecimiento bacteriano, en la dilución adecuada para cada caso. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: 1) Anti-HSP60 monoclonal (clon LK-1, StressGen SPA-806), empleado para el reconocimiento de la proteína homóloga a GroEL. HSP60, a una dilución 1/500; 2) Anti-HSP70 monoclonal (clon C92F3A-5, StressGen SPA-810), que reconoce la forma inducible HSP72 y sus isoformas, a una dilución 1/250; 3) Anti-HSC monoclonal de rata (1B5, StressGen SPA-815), que reconoce la proteína de expresión constitutiva HSP73 y sus isoformas, a una dilución 1/1000; 4) Anti-(HSC70 y HSP70) monoclonal (N27F3-4, StressGen SPA-820), que reconoce ambas proteínas, tanto la forma inducible (HSP72), como la constitutiva (HSP73 o HSC) de la familia de proteínas HSP70 y sus isoformas, a una dilución 1/1500-2500; 5) Anti-Heat Shock Protein 70 (HSP70) monoclonal (clon BRM-22, Sigma), que reconoce ambas tanto la forma inducible (HSP72), como la constitutiva (HSP73 o HSC) de la familia de proteínas HSP70 y sus isoformas, en un epítipo diferente al que reconoce el anterior anticuerpo, a una dilución 1/5000; 6) Anti-GRP75 monoclonal (clon 30A5, StressGen SPA-825), empleado para el reconocimiento de la HSP70 mitocondrial (GRP75) a una dilución de 1/600-1000; 7) Anti-GRP78 monoclonal (clon 10C3, StressGen SPA-827), se utilizó para reconocer la proteína localizada en el lumen del retículo endoplasmático GRP78(BiP), a una dilución 1/250; 8) Anti-HSP90 monoclonal (AC88, StressGen SPA-830), empleado para inmunodetectar la proteína de estrés de localización citoplasmática HSP90, a una dilución 1/700. Todos los anticuerpos fueron ensayados en membranas de geles mono y bi-dimensionales de homogeneizados de proteínas totales para identificar las bandas o puntos de inmunoreactividad, así como la presencia de isoformas. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-(IgG de ratón) policlonal de cabra (Transduction Labs) o anti-(immunoglobulinas de ratón) (Dako) y anti-immunoglobulinas de rata (para el anticuerpo monoclonal anti-HSP73, Dako), conjugados todos con peroxidasa de rábano y a una dilución de 1:1500.

2.6 Análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar del número de animales indicado en la leyenda de las figuras o tablas. En cada experimento, el análisis estadístico se realizó mediante regresión múltiple usando el programa MicroTSP (version 6). También se realizaron comparaciones entre grupos usando el test de la T de Student. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$, y muy significativas cuando $p < 0,01$.

3. RESULTADOS

3.1 Proteínas de estrés en músculo esquelético e hígado

En las figuras 1 y 2 se muestra la caracterización inmunológica de las diferentes proteínas de estrés en el músculo de contracción rápida EDL, en el de contracción lenta sóleo

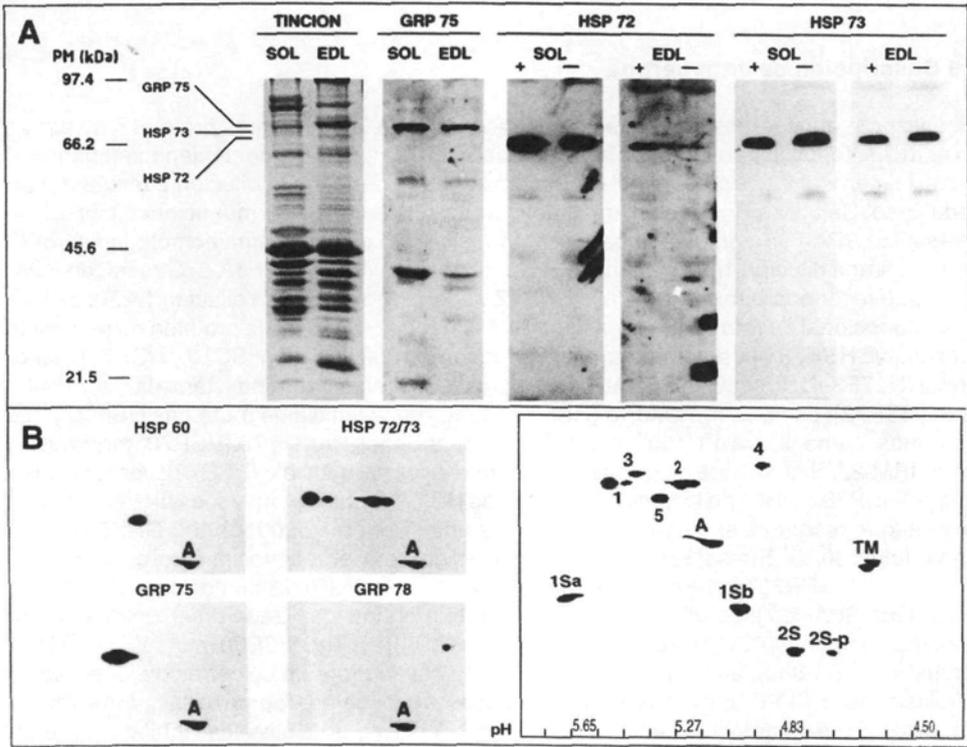


Figura 1. Inmunodetección de proteínas de estrés en extractos de proteínas totales de músculo esquelético separadas mediante electroforesis mono y bidimensional y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas de homogeneizados de músculo sóleo o EDL se separaron mediante electroforesis mono- o bidimensional y se tiñeron con azul de Coomassie o se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa que se tiñeron con rojo Ponceau S para localizar las proteínas miofibrilares (A, actina; TM, tropomyosina; 1sa, 1sb, 2s, 2s-p, isoformas lentas de las cadenas ligeras de la miosina). Diferentes membranas procedentes de geles monodimensionales (panel A, 80 µg de proteína por muestra) o bidimensionales (panel B, 200 µg protein/sample) se ensayaron separadamente con anticuerpos monoclonales específicos. Para obtener la composición con el patrón completo de proteínas de estrés del músculo sóleo, los geles individuales se digitalizaron y se superpusieron sobre un fondo con las proteínas miofibrilares teñidas con rojo Ponceau S. 1, isoformas de HSP72; 2, isoformas de HSP73; 3, GRP75; 4, GRP78; 5, HSP60; SOL, músculo sóleo; EDL, músculo extensor digitorum longus; (-) o (+), animales no ejercitados o ejercitados (2h tras el ejercicio), respectivamente. Tomado de Hernando, R. y Manso, R., Eur. J. Biochem. 243, 460-467 (1987).

y en el hígado. Como puede observarse, algunos anticuerpos reconocen bandas adicionales de proteína además de la del antígeno contra el que están dirigidos. Ello es debido a que, como se menciona en la introducción, la expresión de algunas de estas proteínas en condiciones basales es extraordinariamente baja, por lo que se reconocen inespecíficamente otras proteínas debido a la sensibilidad del método de detección. Esto es particularmente cierto para el caso de la HSP72 hepática cuyos niveles basales (indicados con el signo - en la gráfica) son tan bajos que apenas puede detectarse sobre el fondo de bandas inespecíficas, aunque se observa como una banda nítida en animales ejercitados (indicado en la gráfica con un signo +). Una de las primeras conclusiones que parecen extraerse de estos estudios preliminares es que los niveles de expresión basales de estas proteínas son muy diferentes de unos tejidos a otros e, incluso, de un tipo de fibras a otro. En

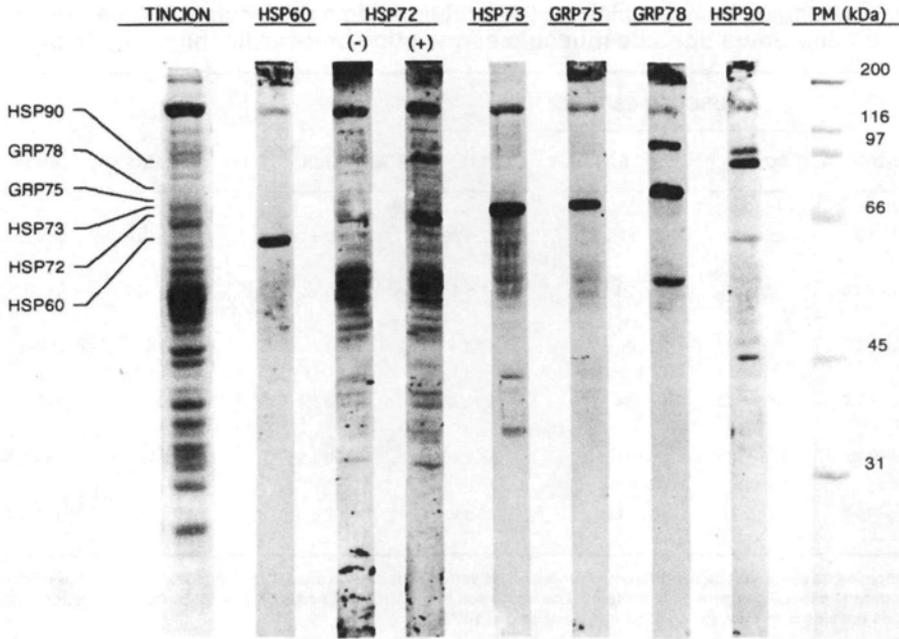


Figura 2. Inmunodetección de proteínas de estrés en extractos de proteínas totales de hígado separadas mediante electroforesis monodimensional y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas de homogeneizados de hígado se separaron mediante electroforesis monodimensional (100 µg de proteína por muestra) y se tiñeron con azul de Coomassie (tinción) o se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa que se ensayaron separadamente con anticuerpos monoclonales específicos que reconocen principalmente la proteína que se indica. Al tratarse de niveles basales, la cantidad de proteína es tan pequeña que a veces resulta difícil apreciar la banda sobre el fondo de reconocimiento inespecífico. Este es el caso de la HSP72 en la que, además de una muestra representativa de animales en reposo (-) se incluye otra de animales ejercitados (+) sacrificados 2h tras el ejercicio.

En la tabla 1 se muestran los niveles de las diferentes proteínas de estrés en varios tipos de músculo esquelético, miocardio, hígado y riñón. Como puede observarse, el músculo sóleo es el que presenta mayores niveles de la proteína HSP72, con mucha diferencia sobre los existentes en otros tipos de músculo o en otros órganos. Sin embargo, la proteína GRP78, de localización en el retículo endoplásmico, es mucho más abundante en condiciones basales en el hígado que en cualquier otro tipo de tejido. Algo similar, aunque no tan marcado ocurre con los niveles basales de la HSP90.

La fig. 1b reproduce las inmunolocalizaciones de las diferentes proteínas de estrés en geles bidimensionales y su superposición después de la digitalización para obtener el patrón de distribución de las diferentes proteínas de estrés en geles bidimensionales, utilizando el músculo sóleo. En la misma figura también se incluyen como referencia las proteínas miofibrilares más prominentes, que se observaron en la membrana mediante tinción con rojo Ponceau S. La proteína GRP78 no se pudo detectar en muestras de músculo en geles monodimensionales (cargando 80µg de proteína por gel), pero si ha podido detectarse en geles bidimensionales en los que se cargaron habitualmente 200µg de proteína. En esta figu-

TABLA 1:
Niveles basales de expresión de las proteínas de estrés mas prominentes en la
rata en diferentes tipos de músculo esquelético, miocardio, hígado y riñón .

PROTEINA	MUSCULO ESQUELETICO			MIOCARDIO	HIGADO	RIÑON
	SOLEO	EDL	TIBIAL			
HSP 90	83 ± 31	44 ± 17	32 ± 22	100 ± 36	258 ± 51	219 ± 45
GRP78	49 ± 18	21 ± 7	7 ± 4	100 ± 21	1611 ± 491	259 ± 42
GRP 75	67 ± 15	21 ± 10	17 ± 7	100 ± 10	91 ± 5	116 ± 5
HSP 73	106 ± 22	84 ± 3	90 ± 4	100 ± 10	122 ± 7	125 ± 11
HSP 72	708 ± 120	111 ± 35	37 ± 15	100 ± 25	32 ± 15	184 ± 54
HSP 60	17 ± 11	4 ± 1	3 ± 2	100 ± 15	120 ± 12	141 ± 13

Los niveles de expresión de las diferentes proteínas de estrés se midieron mediante inmunoreconocimiento utilizando anticuerpos específicos para cada proteína. Los datos son los valores promedio de 5 animales/grupo, referidos a los niveles presentes en miocardio (a los que se asignó el 100%).

ra también se ponen de manifiesto las diferentes isoformas que presentan las proteínas HSP72 y HSP73. La presencia de niveles basales de proteínas de estrés tan diferentes de unos tejidos a otros, e incluso de un tipo de células a otras dentro del mismo tejido plantea cuestiones de gran interés sobre la especificidad funcional de estas proteínas y la naturaleza de los factores que determinan su expresión diferencial.

3.2 Inducción de la síntesis de proteínas de estrés en músculos sóleo y EDL y en hígado después de ejercicio agudo

Después de 1h de carrera en cinta rodante a una velocidad de 27m/min., las velocidades de síntesis de las proteínas de estrés en músculo sóleo (medidas como incorporación de ³⁵S-metionina) se incrementan con respecto a los valores de los animales sedentarios (fig.3). La velocidad de incorporación de ³⁵S-metionina en HSP72 (normalizada con respecto a la que se incorpora en HSP73, en adelante valores normalizados con respecto a HSP73), se incrementa aproximadamente 4 veces cuando se compara con los animales no ejercitados, estimulación que resulta algo más pronunciada que la observada para las restantes proteínas de estrés (2-3 veces de estimulación).

Los mayores niveles de síntesis se presentan ya en los cortes de tejido obtenidos de los animales sacrificados inmediatamente después de terminado el ejercicio. Esto ocurre en todas las proteínas de sóleo y EDL, excepto para la GRP75 de músculo sóleo, cuya síntesis presenta un máximo de estimulación 1 después de terminado el ejercicio. En el EDL también se produce una estimulación de la síntesis de las proteínas de

SOLEO: CINÉTICA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS TRAS EJERCICIO AGUDO

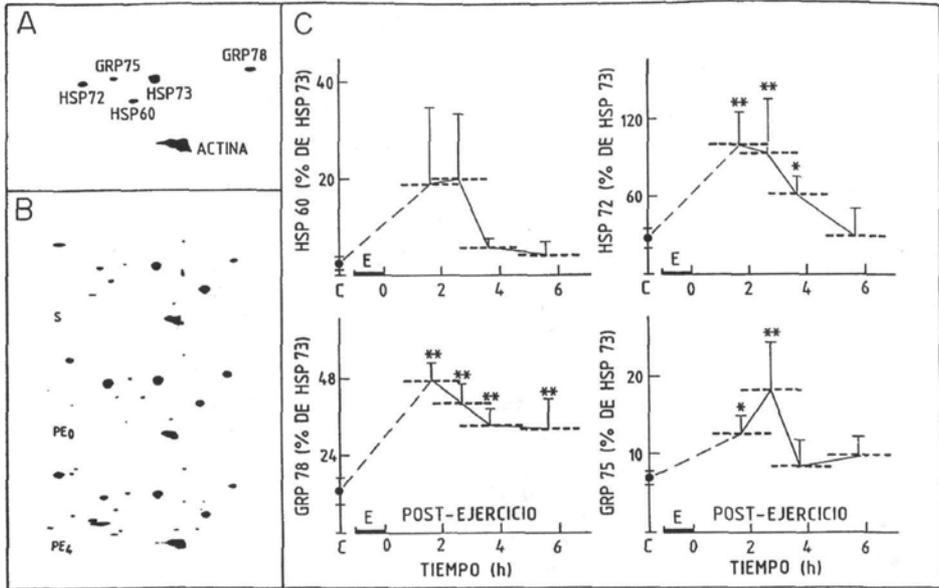


Figura 3. Cinética de síntesis de proteínas de estrés en el músculo sóleo de la rata tras realización de ejercicio físico. El músculo sóleo de las ratas sedentarias (aunque familiarizadas con el funcionamiento del tapiz rodante) se obtuvo in vivo de animales anestesiados sin realización de ejercicio (C, control) ó a 0, 1, 2 ó 4 h después de realizar 1 h de ejercicio en cinta rodante a 27 m/min. De la zona media del músculo se prepararon inmediatamente secciones transversales de 0.75 mm que se equilibraron en medio de cultivo sin metionina y se incubaron posteriormente durante 2h con [³⁵S]Metionina (lo que se indica en la figura mediante una línea discontinua horizontal). La incorporación de radiactividad en las proteínas de estrés se midió mediante densitometría de fluorografías de geles bidimensionales, siempre refiriendo los datos a la proteína de expresión constitutiva HSP73. A) Representación esquemática de la localización y nomenclatura de las proteínas de estrés en los patrones bidimensionales de proteínas del músculo sóleo. B) Autorradiografías de muestras representativas de animales control sin ejercitar (S) o ejercitados y sacrificados inmediatamente después del ejercicio (PE₀) o 4 h después (PE₄). C) Representación gráfica de las velocidades relativas de síntesis de las diferentes proteínas de estrés durante el periodo de postejercicio. Como los cortes finos de tejido siguen siendo metabólicamente activos hasta que son congelados, la escala de tiempos se ha desplazado con respecto al momento del sacrificio. Se representa la media ± DE de 4-5 animales por grupo. **p<0.01, * p<0.05 animales ejercitados frente a los controles sin ejercitar. Tomado de Hernando, R. y Manso, R., Eur. J. Biochem. 243, 460-467 (1987).

estrés con un patrón muy parecido al que presenta el sóleo (fig.4). No obstante, la velocidad de incorporación de radiactividad en proteínas durante la incubación (medida como material radiactivo insoluble en ácido) fué en el músculo EDL considerablemente menor (60%) que en el músculo sóleo. Los niveles de síntesis de la chaperonina HSP60 se incrementaron en el músculo EDL después del ejercicio de forma más consistente que en el sóleo. Sorprendentemente, el hígado, un tejido que actúa como integrador metabólico del organismo y que tiene funciones trascendentales para la homeostasia energética pero que no tiene funciones contáctiles como las específicas del músculo esquelético, también presenta una respuesta de estrés en muchos aspectos de características análogas a la del músculo esquelético (fig. 5), tanto en los aspectos cinéticos como en los niveles de estimulación (HSP72, GRP75 y HSP60). No obstante, la respuesta de estrés de las células hepáticas es peculiar en lo referente a la cinética de inducción de la proteína GRP78 (fig. 5), con el valor máximo (y

EDL: CINÉTICA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS TRAS EJERCICIO AGUDO

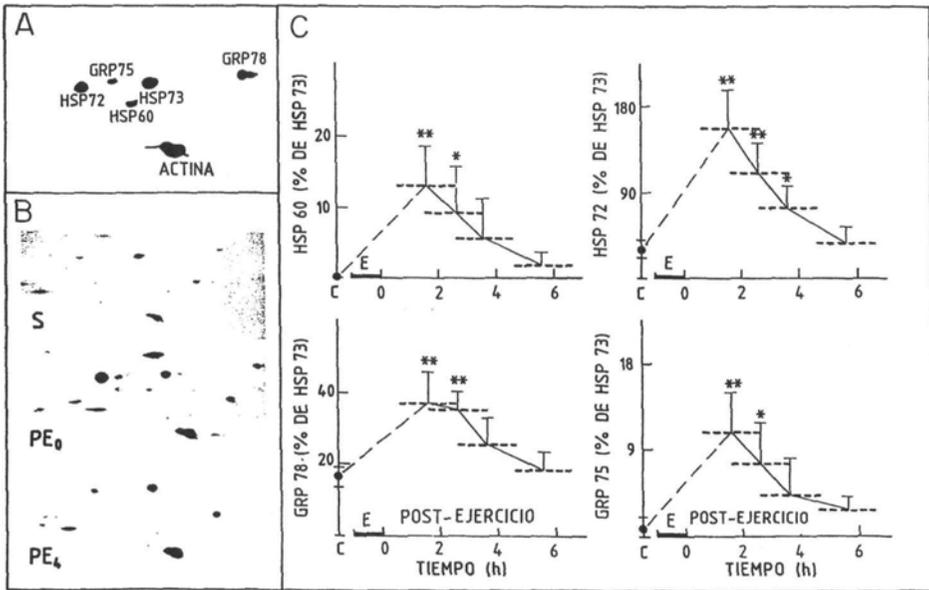


Figura 4. Cinética de síntesis de proteínas de estrés en el músculo de contracción rápida de la rata, EDL, tras la realización de ejercicio. Todos los detalles experimentales, a excepción del tipo de músculo utilizado se corresponden con lo que se indica al pie de la figura 3. También en este caso la escala de tiempos se ha desplazado en relación con el momento del sacrificio de los animales para tener en cuenta el tiempo transcurrido para el marcaje. Se representa el valor medio \pm DE de 4-5 animales por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ animales ejercitados frente a controles sin ejercitar. Tomado de Hernando, R. y Manso, R., Eur. J. Biochem. 243, 460-467 (1987).

probablemente en situación ascendente todavía) en el último punto considerado del periodo de postejercicio.

La comparación de estos datos de inducción de la síntesis de proteínas de estrés (en dos tipos de músculo con diferente grado de participación en la actividad locomotriz y en un órgano metabólicamente fundamental pero no contráctil) sugiere que la actividad contráctil en sí misma, o cualquier factor derivado exclusivamente de ella, no es responsable de la inducción de la respuesta de estrés. Más bien debe existir algún factor común que sea producido y distribuido por todo el organismo al que tengan acceso y sean sensibles por igual las células hepáticas y las musculares.

3.3 Acumulación de proteínas de estrés tras ejercicio agudo en músculos sóleo y EDL y en hígado

Como ya se sugería por los cambios observados en las velocidades de síntesis, después de un ejercicio agudo los niveles de la mayoría de las proteínas de estrés sufren incrementos tanto en los dos tipos de músculo estudiados como en el hígado. La HSP72 (fig. 6), al parecer la HSP que responde de forma más acusada al estrés del ejercicio, aumentó sus niveles en los músculos sóleo y EDL y en el hígado durante el

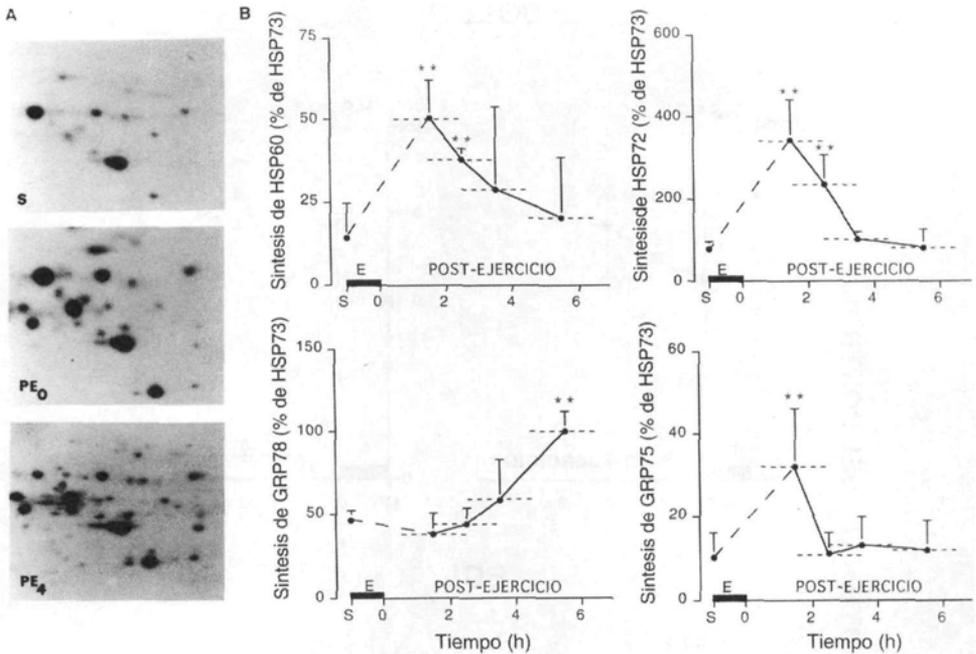
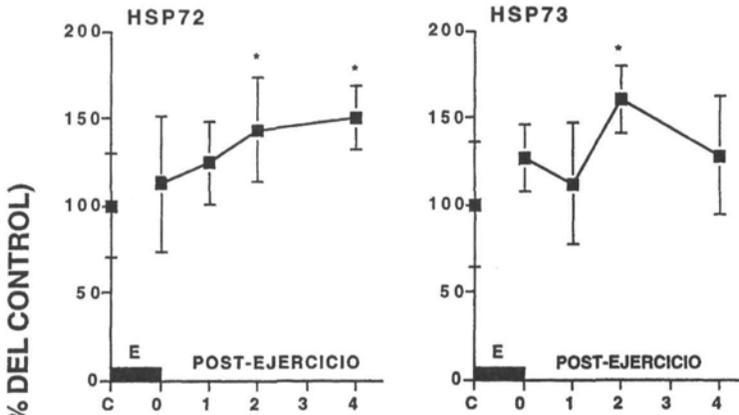


Figura 5. Cinética de síntesis de proteínas de estrés en el hígado de la rata tras la realización de ejercicio. Todos los detalles experimentales, con la excepción del tipo de tejido utilizado, se corresponden con lo que se indica al pie de la figura 3. La escala de tiempos también se ha desplazado en relación con el momento del sacrificio de los animales para tener en cuenta el tiempo transcurrido durante el marcaje. Se representa el valor medio \pm DE de 4-5 animals por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ animales ejercitados frente a controles sin ejercitar.

periodo de postejercicio. Es interesante destacar que la cinética de acumulación que presenta la HSP72 en cada uno de los músculos es diferente (fig. 6). En el músculo sóleo (en donde los niveles basales son comparativamente muy altos) se produjo un incremento gradual y constante a lo largo del periodo de postejercicio de hasta un 160% con respecto al control, mientras que en el EDL, con niveles basales del orden del 14% con respecto a los del sóleo, la cantidad de HSP72 muestra un rápido incremento en las 2 primeras horas tras el ejercicio hasta alcanzar cerca de un 200% del control, bajando a continuación rápidamente. En el hígado (donde los niveles de esta proteína son solo del 5% los del sóleo) se observa una inducción muy elevada de hasta un 500% a las 2h, tendiendo a bajar a las 4h postejercicio (fig 7). Los niveles medios de la proteína de expresión constitutiva HSP73 presentan cierta tendencia a incrementarse durante el periodo de postejercicio en ambos tipos músculos (fig. 6). Para ambos tipos de músculo las diferencias entre grupos no resultaron significativas cuando se realizó el análisis de regresión múltiple pero si lo fueron al comparar el grupo control y el de 2 horas postejercicio mediante la T de Student, lo que indica que la cantidad de HSP73 se modifica ligeramente tras el ejercicio, probablemente también como consecuencia de un aumento transitorio en su velocidad de síntesis (y/o reducción de su velocidad de degradación). Una estimación de la magnitud de la velocidad de síntesis de esta proteína se hizo normalizando la incorporación de radiactividad en cada muestra por el tiempo de exposición, la incorporación específica de radiactividad, el decaimiento

SOLEO



EDL

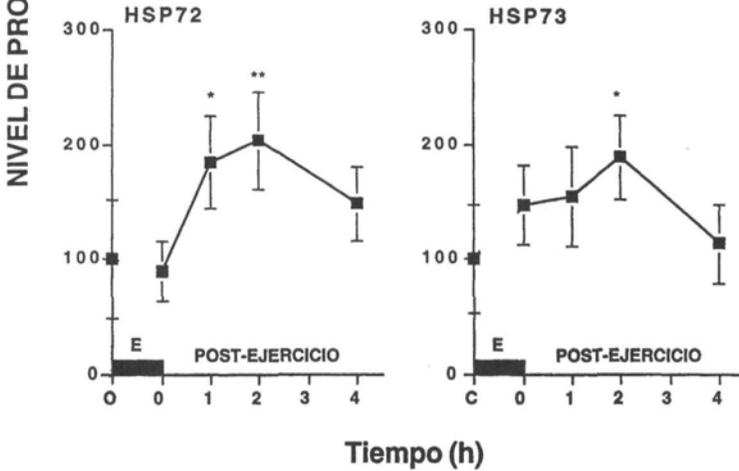


Figura 6. Acumulación durante el periodo postejercicio de la proteína de estrés inducible, HSP72, y de la de expresión constitutiva, HSP73, en los músculos sóleo y EDL de la rata. Los músculos sóleo y EDL se obtuvieron in vivo de animales sin entrenar que se anestesiaron y sacrificaron antes de realizar ejercicio (C, control) ó 0, 1, 2 ó 4 h después de realizar 1 h de carrera en cinta rodante a 27 m/min (E), y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. Las proteínas de estrés se separaron mediante electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las cantidades relativas se determinaron separadamente usando anticuerpos monoclonales que reconocían a cada una de las proteínas sin presentar reacción cruzada con la otra. Para más información consúltese la sección dedicada a métodos. Contrastando con los datos de síntesis de proteínas de estrés, que se dan en las figuras 3 a 5, los niveles de las proteínas HSP72 y HSP73 que se midieron por inmunorreconocimiento corresponden prácticamente con los valores presentes in vivo en el tiempo indicado del postejercicio. Los datos corresponden a la media ± DE de 4-5 ratas por grupo. **p<0.01, *p<0.05, animales ejercitados frente a controles sin ejercitar. Tomado de Hernando, R. y Manso, R., Eur. J. Biochem. 243, 460-467 (1987).

sufrido y la cantidad de proteína efectiva cargada en cada gel. Esta estimación indica que la velocidad de síntesis de la proteína HSP73 aumenta en aproximadamente un 39% (como media) en los cortes de músculo de los animales sacrificados 1h postejercicio y vuelve a los niveles del control a las 4h postejercicio, lo que probablemente justifica la subida transitoria observada. En el hígado los niveles de HSP73 no sufrieron modificaciones (fig. 7).

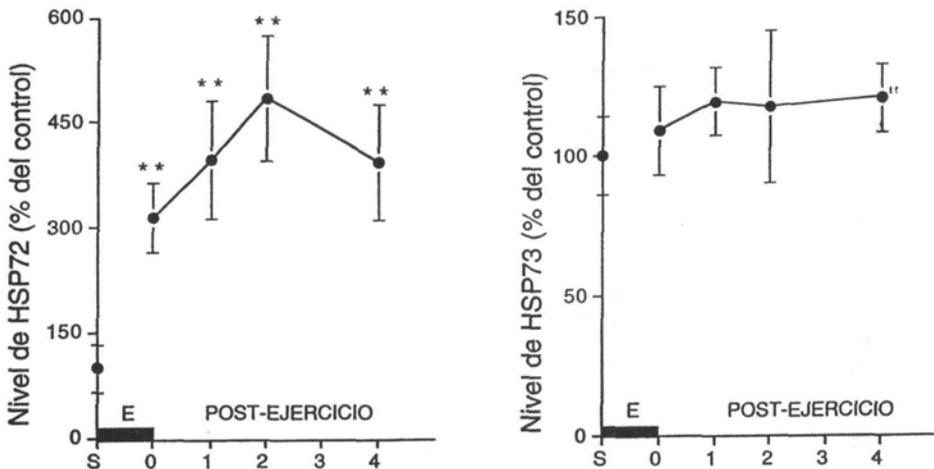


Figura 7. Acumulación durante el periodo postejercicio de las proteínas de estrés de localización citoplasmática-nuclear HSP72 y HSP73 en hígado de rata. El hígado se perfundió con el animal anestesiado, inmediatamente antes de su extracción, tras lo que se congeló inmediatamente en N_2 líquido. Todos los aspectos metodológicos, con la excepción de lo referente al tipo de tejido, coinciden con lo que indica al pie de la figura 6. Los datos corresponden a la media \pm DE de 4-5 ratas por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, animales ejercitados frente a controles sin ejercitar.

En lo referente a las proteínas de estrés mitocondriales (la GRP75 y la chaperonina HSP60), los niveles basales de la HSP60 en el músculo EDL son muy bajos. En el músculo sóleo, aunque mucho menos abundante que en el hígado, esta proteína ya pudo cuantificarse, lo que permitió observar como se redujeron sus niveles (fig. 8) en las primeras horas tras el ejercicio hasta cerca del 50% de su valor inicial para recuperarse en las horas siguientes, probablemente coincidiendo con el pico de síntesis inducida por el ejercicio (véase fig. 3). En el hígado, sin embargo, se observa un aumento de esta proteína de aproximadamente un 30%, ya apreciable 1h tras ejercicio y que se mantiene en las horas posteriores (fig. 9) La GRP75, como ya se ha indicado anteriormente para la HSP72, tiene un comportamiento dispar en los músculos sóleo y EDL (fig. 8). Sufre una subida gradual en el músculo sóleo, en donde llega a alcanzar valores del 150% sobre el control sedentario a las 4h postejercicio, mientras que en el músculo EDL tiene inicialmente una subida transitoria que a las 4h se convierte en una reducción de niveles de aproximadamente el 50% (fig. 8). En el hígado, en donde los niveles basales de GRP75 son solo ligeramente superiores a los del músculo sóleo (y unas 4 veces los del EDL), se observó un aumento próximo al 200% después del ejercicio que se mantiene durante todo el periodo de postejercicio estudiado. (fig. 9).

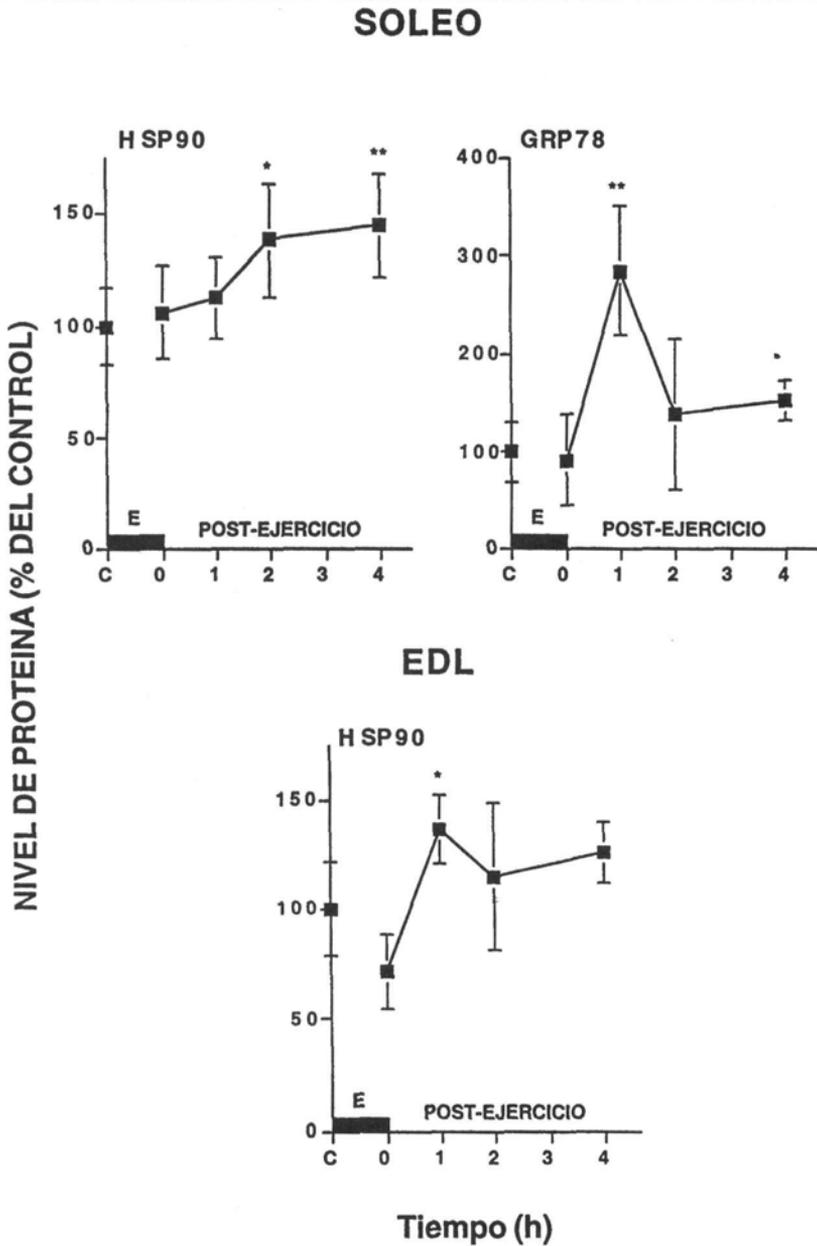


Figura 8. Acumulación durante el periodo de postejercicio de las proteínas de estrés mitocondriales GRP75 y HSP60 en músculo esquelético de la rata. Los músculos sóleo y EDL se extrajeron in vivo con el animal anestesiado, sin realizar actividad física o a los tiempos postejercicio que se indica en el pie de la figura 6, tras lo que se congeló inmediatamente en N₂ líquido. Los detalles experimentales se indican al pie de la figura 6 y en la sección de métodos. Los datos corresponden a la media ± DE de 4-5 ratas por grupo. **p<0.01, *p<0.05, animales ejercitados frente a controles sin ejercitar.

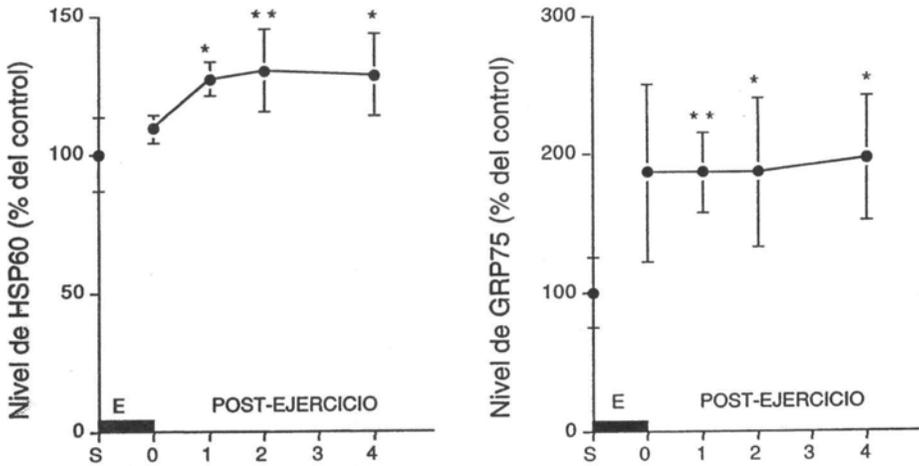


Figura 9. Acumulación durante el periodo de postejercicio de las proteínas de estrés mitocondriales GRP75 y HSP60 en hígado de rata. Todos detalles experimentales, con la excepción de lo referente al tipo de tejido, coinciden con lo que se indica al pie de las figura 6 y 8. Los datos corresponden a la media \pm DE de 4-5 ratas por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, animales ejercitados frente a controles sin ejercitar.

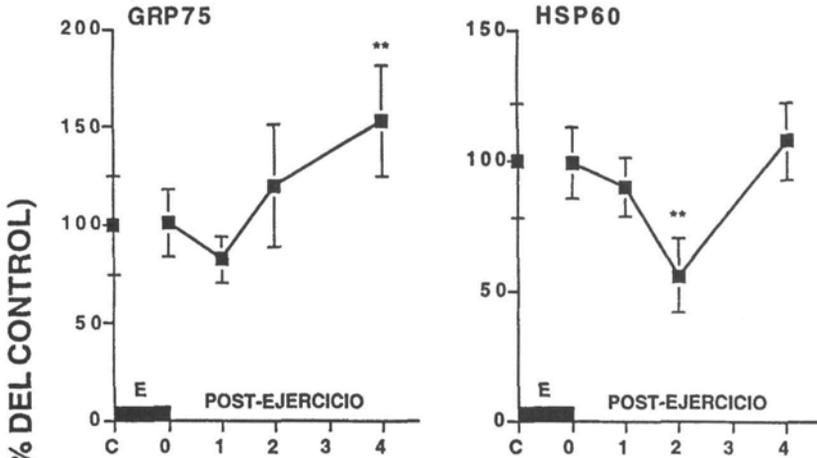
La proteína de estrés localizada en el retículo endoplásmico GRP78 también tiene niveles basales muy pequeños en el músculo EDL. En el músculo sóleo (fig. 10) la GRP78 sufrió una subida transitoria hasta alcanzar niveles del orden del 250% en la primera hora postejercicio para regresar posteriormente a los valores del control. En el hígado (fig. 11), sin embargo, se produjo una acumulación efectiva de esta proteína, ya inmediatamente después del ejercicio, que se mantiene a niveles próximos al 175% del control a lo largo del periodo postejercicio.

Además de la chaperonina mitocondrial HSP60, a la que ya se ha hecho referencia anteriormente al hablar de las proteínas de estrés mitocondriales, también se estudiaron los cambios en los niveles de expresión de otra proteína no perteneciente a la familia de HSPs de 70 kDa, la HSP90. Esta proteína, que tiene niveles de expresión basal relativamente bajos en músculo EDL, mayores en músculo sóleo (200%) y todavía mucho mayores en hígado (500%), no sufrió modificación alguna por el ejercicio en este último órgano (fig. 11) y solamente cambios ligeros y transitorios en el músculo EDL (fig. 10). En el músculo sóleo (fig. 10) se observó un aumento de niveles más consistente y estable, aunque de magnitud relativamente baja (aprox. 140% sobre el control sedentario).

4. DISCUSIÓN

La inducción de la síntesis de proteínas de estrés en el músculo esquelético por el ejercicio puede ponerse de manifiesto de forma directa estudiando en cortes de tejido la incorporación de un precursor radiactivo de proteínas (p. ej. la metionina marcada con el isótopo 35 del azufre, la ^{35}S -metionina) y analizando la cantidad de radiactividad que se incorpora en relación con una proteína de referencia cuya síntesis apenas se modifica por las situaciones externas (una "proteína de mantenimiento" de expresión

SOLEO



EDL

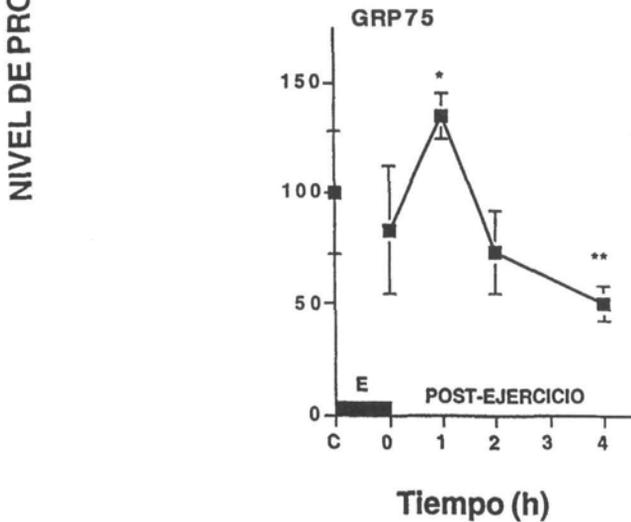


Figura 10. Acumulación durante el periodo de postejercicio de la proteína de estrés de retículo endoplásmico GRP78 y la citoplasmática HSP90 en el músculo esquelético de la rata. Los músculos sóleo y EDL se extrajeron in vivo con el animal anestesiado, sin realizar actividad física o a los tiempos postejercicio que se indica en el pie de la figura 6, tras lo que se congeló inmediatamente en N₂ líquido. Los detalles experimentales se indican al pie de la figura 6 y en la sección de métodos. Los datos corresponden a la media \pm DE de 4-5 ratas por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, animales ejercitados frente a controles sin ejercitar.

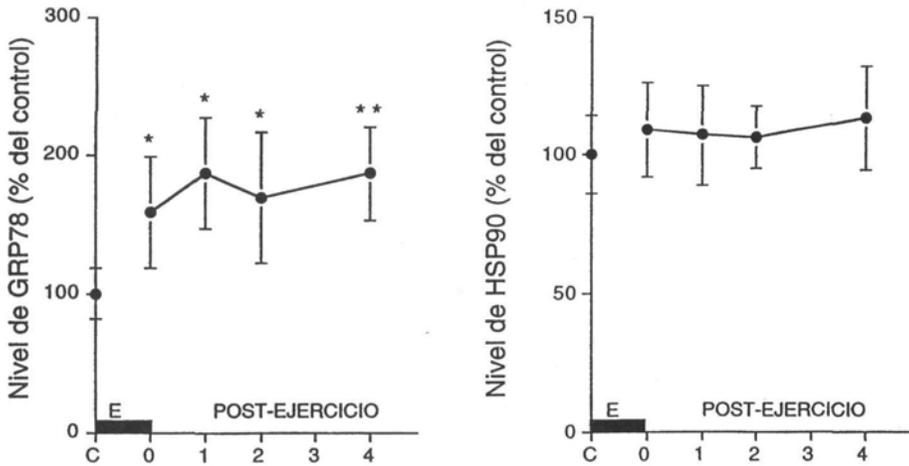


Figura 11. Acumulación durante el periodo de postejercicio de la proteína de estrés de retículo endoplásmico GRP78 y la citoplasmática HSP90 en el hígado de la rata. Todos detalles experimentales, con la excepción de lo referente al tipo de tejido, coinciden con lo que se indica al pie de las figura 6 y 10. Los datos corresponden a la media \pm DE de 4-5 ratas por grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, animales ejercitados frente a controles sin ejercitar.

constitutiva). Cuando las muestras de tejido se homogeneizan, se someten a electroforesis bidimensional y se detectan las proteínas radiactivas mediante una película de rayos X o mediante sensores bidimensionales que detectan y acumulan las radiaciones ionizantes emitidas por una película fotoestimulable (que es unas 100 veces más sensible que la película de rayos X), cada especie molecular, es decir, tanto la proteína resultante de la traducción como sus modificaciones covalentes, aparecen en localizaciones definidas que pueden caracterizarse por sus coordenadas en relación con las de algunas proteínas de referencia. Las proteínas también pueden caracterizarse por inmunodetección, en cuyo caso suelen reconocerse la proteína y todos sus productos de modificación covalente. Este método ha sido utilizado en este trabajo para analizar cambios en la velocidad de síntesis de proteínas y determinar las modificaciones en los niveles de expresión de las mismas tras la realización de una única sesión de ejercicio en animales sin entrenamiento previo.

La cuestión de fondo que se aborda, relativa a si la respuesta de estrés en el músculo esquelético tiene lugar exclusivamente en los músculos activos o, por el contrario, también puede tener lugar en músculos menos implicados en la actividad locomotriz, es relevante para comprender la naturaleza de la señal que induce la respuesta de estrés en el músculo esquelético y, quizás también, para conocer el estímulo inductor de las respuestas adaptativas al entrenamiento. Los resultados que aquí se presentan ponen claramente de manifiesto que la respuesta de estrés en el músculo esquelético no se confina a los músculos activos, sino que también se produce en otros músculos menos activos y en el hígado, con cinéticas de inducción similares. Este resultado es chocante porque uno de los principios asumidos como dogma en relación con el ejercicio es el de la especificidad, es decir, solamente responden y se adaptan los músculos que se ejercitan activamente. Los datos que se presentan sugieren que el agente inductor de la respuesta de estrés muscular, sea éste cual sea, no se produ-

ce exclusivamente en el músculo como consecuencia de la actividad contráctil, sino que es producido o distribuido por todo el organismo.

La existencia de una respuesta generalizada del músculo esquelético al estrés físico es consistente con la función biológica que actualmente se asigna a las proteínas de estrés. Las formas primitivas de ejecución de actividad física (dirigidas a la captura de presas o a la huída de los depredadores) probablemente implicaban a la mayoría de los grupos musculares. Como la respuesta de estrés parece haberse desarrollado a lo largo de la evolución para proteger las células de los daños inducidos por el estrés y prepararlas para sobrevivir a nuevas agresiones ambientales, resulta concebible que la percepción por el músculo de una señal sostenida potencialmente asociada al reclutamiento de las fibras musculares, pueda ser suficiente para activar la transcripción de los genes de estrés incluso en el caso de que esas fibras no lleguen a utilizarse extensamente. A pesar del costo biosintético relativamente elevado de una inducción anticipada de la síntesis de proteínas de estrés, este mecanismo de anticipación es probablemente una estrategia evolutiva adecuada para prevenir las graves consecuencias que un daño muscular masivo pudiera tener para la supervivencia del individuo.

Por otro lado, los datos que se presentan indican que la respuesta de estrés en ambos tipos de músculo es sustancialmente diferente. La acumulación efectiva de proteínas de estrés, particularmente la HSP72, se produjo exclusivamente en el músculo sóleo. Esta diferencia de comportamiento puede ser consecuencia de propiedades inherentes a las fibras rápidas y lentas que podrían contribuir a explicar por qué los niveles de esta proteína son tan bajos en el músculo EDL en relación con el sóleo, pero también puede reflejar la existencia de un mecanismo capaz de discriminar las fibras en las que debe producirse necesariamente la acumulación de proteínas de estrés. Aunque todavía no existen evidencias experimentales que confirmen la existencia de un mecanismo de este tipo, la presencia de proteínas desnaturalizadas, la estabilización dependiente de la actividad contráctil de las proteínas de estrés recién sintetizadas o la inhibición de la ruta proteolítica implicada en su degradación, podrían constituir mecanismos plausibles para explicar la expresión estable de proteínas de estrés en fibras activas.

La observación de que el nivel basal de expresión de la proteína HSP72 en músculos formados por fibras de tipo I es mucho mayor que el existente en fibras de tipo II o en otros tejidos con elevada capacidad oxidativa como es el miocardio o el hígado, mientras que los niveles basales de la proteína de expresión constitutiva HSP73 son relativamente próximos en diferentes tipos de músculo y en otros tejidos, pone de manifiesto que la expresión de ambas proteínas no está coordinada y sugiere que la proteína HSP72 realiza una función específica en el músculo que solamente prevalece en las fibras de tipo lento. Debido a la elevada capacidad oxidativa de estas fibras, una de las funciones que se sugieren para la HSP72 es la protección o reparación de proteínas sometidas a estrés oxidativo. Esta interpretación podría contribuir a explicar las diferencias en los niveles de expresión de esta proteína en diferentes tipos de fibras esqueléticas pero resulta inadecuada para explicar los niveles basales extraordinariamente bajos de esta proteína en tejidos altamente oxidativos como el miocardio y el hígado. Sin embargo, hay que considerar que la protección contra el estrés oxidativo podría regularse independientemente en cada tipo de células y que cada uno

de los mecanismos de defensa puede contribuir con diferente peso específico para garantizar la integridad celular en diferentes tejidos. La actividad de las enzimas de defensa antioxidante, por ejemplo, es mucho mayor en el hígado que en el músculo esquelético. Por ello, las células hepáticas, más protegidas contra una elevación de los niveles de radicales libres que las células musculares, no necesitarían expresar niveles muy altos de proteínas de estrés relacionadas con la defensa al estrés oxidativo (como podría ser la HSP72), aunque expresen niveles altos de otras proteínas de estrés diferentes (como podría ser, p. ej., el chaperón molecular localizado en el retículo endoplásmico, GRP78). Sea esta o no la explicación de tan notables diferencias en la expresión basal de esta proteína, resultaría de gran interés conocer la razón de que el músculo esquelético haya sido tan pobremente dotado de enzimas de defensa antioxidante.

Aunque no se incluye información detallada en este trabajo, se han obtenido resultados que indican que la proteína HSP72 puede presentar diferentes isoformas, de las que una parece generarse por un proceso de fosforilación. Precisamente la proporción de esta proteína se incrementa en el músculo sóleo tras el estrés inducido por el ejercicio. Aunque aún se desconoce la posible importancia fisiológica de este proceso de fosforilación para la funcionalidad de esta proteína, la posibilidad de que la fosforilación pueda contribuir a la estabilización de la HSP72 que se sintetiza tras el estrés impuesto por el ejercicio abre nuevas perspectivas para entender como podría controlarse la estabilidad de las proteínas de estrés en los músculos activos.

Por último, en relación con la señal inducida por el ejercicio que se sugiere en este trabajo que desencadenaría una respuesta generalizada de estrés en diferentes tipos de músculo esquelético y en otros tejidos, existen algunos datos recientes procedentes de otros laboratorios que apuntan hacia cambios en la presión sanguínea, posiblemente a través de la formación de óxido nítrico, como el mecanismo responsable de la activación de los genes de estrés en varios tejidos en respuesta a una situación de estrés in vivo. Como el ejercicio físico está asociado a cambios hemodinámicos profundos que ocurren tras la activación del sistema nervioso simpático, podría existir una relación causal entre la activación de la respuesta simpática de estrés y la inducción de la síntesis de proteínas de estrés en los diversos tejidos. La participación del sistema endocrino como mediador de este proceso ofrece una vía para entender la ubicuidad de la respuesta celular de estrés al ejercicio físico. La elevación de los niveles de glucocorticoides y la inducción de HSPs son una respuesta común a numerosos agentes estresantes, y las HSPs interaccionan con el receptor de glucocorticoides facilitando su activación por la hormona. La posibilidad de que exista una asociación entre la respuesta celular de estrés (HSP 70/90) y la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal ha sido estudiada en un caso, utilizando la inmovilización como sistema modelo de estrés. Aunque la inmovilización tiene un efecto activador acusado del eje HHA (aumentos considerables de la ACTH y de la corticosterona, que es el principal glucocorticoide en la rata), no se incrementan los niveles estacionarios de las HSP 70/90 en distintas zonas cerebrales ni en tejidos periféricos, lo que sugiere que, en este sistema, las proteínas de estrés no parecen ser moduladas por el eje HHA. Sin embargo, datos de nuestro laboratorio sobre la expresión de proteínas de estrés en el músculo esquelético de animales tratados con esteroides anabolizantes indican que la administración de decanoato de nandrolona, a una dosis suprafarmacológica próxima

a las que se sabe son utilizadas en medios deportivos como dopaje, puede incrementar los niveles de expresión de la proteína inducible HSP72.

Las catecolaminas producidas en las terminaciones nerviosas catecolaminérgicas y en la medula adrenal, son también un elemento fundamental de la respuesta del organismo a la iniciación del ejercicio físico y tienen un papel esencial en la regulación de la homeostasis. Entre los agonistas sintéticos de las catecolaminas se encuentran numerosos agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos tales como la hipertensión, shock, insuficiencia cardíaca y arritmias, asma y alergias. Resultados en curso en nuestro laboratorio indican que el clenbuterol, un agonista β 2-adrenérgico con actividad anabolizante y de cuyo uso en medios deportivos se han obtenido evidencias en los últimos años, también modifica los niveles de expresión de diversas proteínas de estrés.

4.1 Conclusiones

En su conjunto, los datos que se han comentado anteriormente sugieren que el ejercicio físico, mediante la inducción de uno o varios agentes estresantes y con la posible participación mediadora del sistema endocrino, es capaz de provocar una respuesta de estrés en diversos tejidos del organismo. La inducción de proteínas de estrés puede ser considerada una consecuencia temprana de la exposición de las células a condiciones adversas que pudieran comprometer la integridad tisular, por lo que estas proteínas constituyen marcadores sensibles para el estudio de posibles agentes estresantes. Sin embargo, en el caso del ejercicio físico aún permanece una gran incógnita sobre la cuestión de fondo de si la inducción de la respuesta de estrés es solamente eso, una consecuencia negativa de la exposición de las células del organismo a una situación de estrés o, por el contrario, constituye realmente el primer paso para la adaptación del organismo a situaciones de uso incrementado. Dicho en términos sencillos, la respuesta de estrés del músculo esquelético podría ser la señal, y el primer paso, para la adaptación al entrenamiento. Si esto es así, y existen razones para pensar que sí, el estudio pormenorizado de los cambios de expresión de estas proteínas a diferentes tipos de ejercicio podría servir como un indicador sensible del estado de adaptación del individuo al entrenamiento.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a M. Casanova y M.L. Vega Clemente por su excelente asistencia técnica, a E. Fernández por su colaboración en el desarrollo de los experimentos en los estadios iniciales del trabajo y a J. Palacín por su colaboración en el cuidado y atención de los animales de experimentación. Los datos que aquí se presentan constituyen parte de los trabajos de doctorado de R. Hernández y B. González y han sido publicados parcialmente en la revista Eur. J. Biochem. 243,460-467 (1997). Este trabajo ha sido realizado con financiación procedente de la **Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, SAF94-0860)**. R.H. y B.G han recibido becas financiadas en parte por el **Consejo Superior de Deportes (08/SUII/96 y 16/UNI10/97)** y la **Universidad Autónoma de Madrid**. El Centro de Biología Molecular recibe una ayuda institucional de la **Fundación Areces**.

6. BIBLIOGRAFÍA

- CHAMBERLAIN, J.P. (1979) Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate, *Analytical Biochem.* 98, 132-135.
- CURRIE, R. W. y WHITE, R.P. (1983) Characterization of the synthesis and accumulation of a 71-kDa protein induced in rat tissues after hyperthermia, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 438-446.
- GETHING, M. J. y SAMBROOK, J. (1992) Protein folding in the cell, *Nature (London)* 355, 33-46.
- GUERRIERO, V., RAYNES, D.A. y GUTIERREZ, J.A. (1989) Hsp 70-related proteins in bovine skeletal muscle, *J. Cell Physiol.* 140, 471-477.
- HAMMOND, G. L., LAI, Y.-K. y MARKERT, C.L. (1982) Diverse forms of stress lead to new patterns of gene expression through a common and essential metabolic pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3485-3488.
- KELLY, P. M. y SCHLESINGER, M. J. (1978) The effect of aminoacid analogs and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts, *Cell* 15, 1277-1282.
- IWAKI, K., CHI, S.-H., DILLMAN, W.H. y MESTRIL, R. (1993) Induction of HSP70 in cultured rat neonatal cardiomyocytes by hypoxia and metabolic stress, *Circulation* 87, 2023-2032.
- JI, L. L., STRATMAN, F. W. y LARDY, H.A. (1988) Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle: Influences of selenium deficiency, chronic training and acute exercise, *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 150-160.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)* 227, 680-685.
- LAUGHLIN, M. H. y ARMSTRONG, R.B. (1983) Rat muscle blood flows as a function of time during prolonged slow treadmill exercise, *Am. J. Physiol.* 244, H814-H824.
- LEE, A.S. (1987) Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells, *Trends Biol. Sci.* 12, 20-23.
- LEUSTEK, T., AMIR-SHAPIRA, D., Toledo, H., Brot, N. y Weissbah, H. (1992) Autophosphorylation of 70 kDa heat shock proteins, *Cell. Mol. Biol.* 38, 1-15.
- LOCKE, M., NOBLE, E. G. y ATKINSON, B.G. (1990) Exercising mammals synthesize stress proteins, *Am. J. Physiol.* 258, C723-C729.
- LOCKE, M., NOBLE, E.G. y ATKINSON, B.G. (1991) Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle type specific pattern, *Am. J. Physiol.* 261, C774-C779.
- MALYSHEV, I. Y., MANUKHINA, E. B., MIKOYAN, V. D., KUBRINA, L. N. y VANIN, A. F. (1995) Nitric oxide is involved in heat-induced HSP70 accumulation. *FEBS Lett.* 370, 159-162.
- HERNANDO, R. y MANSO, R. (1997) Muscle fibre stress in response to exercise. Synthesis, accumulation and isoform transitions of 70 kDa heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.* 243, 460-467.
- MIZZEN, L.A., KABLING, A.N. y WELCH, W. J. (1991) The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp 75 and hsp 58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins, *Cell Regul.* 2, 165-179.
- MORIMOTO, R. I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes, *Science* 259, 1409-1412.
- MORIMOTO, R. I., TISSIÈRES, A. y GEORGOPOULOS, C., eds (1994) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

- O'FARRELL, P.H. (1975) High resolution two dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- POUYSSÉGUR, J. R., SHIN, P. C. y PASTAN, I. (1977) Induction of two transformation sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation, *Cell* 11, 941-947.
- RYAN, A. J., GISOLFI, C. V. y MOSELEY, P.L. (1991) Synthesis of 70KDa stress protein by human leucocytes: Effect of exercise in the heat, *J. Appl. Physiol.* 70, 446-471.
- SALO, D. C., DONOVAN, C. M. y DAVIES, K. J. A. (1991) HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver during exercise, *Free Radic. Biol. Med.* 11, 239-246.
- SAMBROOK, J. F. (1990) The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum, *Cell* 61, 197-199.
- SKIDMORE, R., GUTIERREZ, J. A., GUERRIERO, V. y KREGEL, K.G. (1995) HSP 70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature, *Am. J. Physiol.* 268, R92-R97.
- SORTZ, G., TARTAGLIA, L.A. y AMES, B.N. (1979) Transcriptional regulation of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation, *Science* 248, 189-194.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. y GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- VILLA, A., PODINI, P., CLEGG, D. O., POZZAN, T. y MELDOLESI, J. (1991) Intracellular Ca²⁺ stores in chicken Purkinje neurons: Differential distribution of the low affinity-high capacity Ca²⁺-binding protein, calsequestrin, of Ca²⁺-ATPase and of the ER luminal protein, BiP, *J. Cell. Biol.* 113, 779-791.
- WELCH, W. J. y FERAMISCO, J. R. (1985) Rapid purification of mammalian 70,000 dalton heat-shock protein: Affinity of the proteins for nucleotides, *Mol. Cell. Biol.* 5, 1229-1237.
- WELCH, W. J. (1992) Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease, *Physiol. Rev.* 72, 1063-1081.
- XU, Q., Li, D-G., HOLBROOK, N. J. y UDELSMAN, R. (1995) Acute hypertension induces heat-shock protein 70 gene expression in rat aorta, *Circulation* 92, 1223-1229.

EFECTO DE LOS ESTEROIDES ANABÓLICO-ANDROGÉNICOS DECANOATO DE NANDROLONA Y ESTANOZOLOL SOBRE LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO-GONADAL Y LA FUNCIÓN LINFOCITARIA

*Hernando, R.¹
Ferrández, M^a. D.²
Fuente, M. de la²
Díaz, A. E.³
y Manso, R.¹*

¹Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular
"Severo Ochoa" (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid

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

³Centro de Medicina Deportiva, CNICD, Consejo Superior de Deportes

Dirección para correspondencia:

Rafael Manso, Departamento de Biología Molecular,
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM),
Universidad Autónoma de Madrid, Canto Blanco, 28049-Madrid.

Tel. 91 3974871

Fax: 91 3974799

E-mail: Rmanso@cbm.uam.es



Raquel Hernando Sebastián: es Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid. Se encuentra en la actualidad en la fase de redacción de su tesis doctoral que ha dedicado al estudio de 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), en la Universidad Autónoma de Madrid.



María 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.



Angel Enrique Díaz Martínez: es licenciado en Ciencias Biológicas y especialista en Bioquímica Clínica. Actualmente es Jefe de Servicio del Laboratorio Clínico del Centro Nacional de Medicina Deportiva en el Centro Nacional de Investigación y Ciencias del Deporte del Consejo Superior de Deportes.



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, en la que es actualmente Prof. 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 (actual CNICD) y miembro del Comité de Expertos en Investigación en Materia Deportiva del Consejo de Europa entre 1988 y 1990. Dirige en la actualidad un grupo de investigación dedicado al estudio de los mecanismos moleculares de adaptación al entrenamiento en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), en la Universidad Autónoma de Madrid.

Resumen: Algunos derivados sintéticos de las hormonas sexuales, que comparten con la testosterona la actividad androgénica y anabólica (por lo que se les agrupa bajo la denominación de esteroides anabólico-androgénicos, EAA), son utilizados en medios deportivos con la intención de incrementar el rendimiento en la competición a pesar de que existen evidencias de que su administración a dosis suprafarmacológicas durante periodos prolongados de tiempo pudiera ser dañina para la salud. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos investigadores realizados, todavía no se tienen datos ciertos ni sobre las células sensibles ni sobre los mecanismos moleculares que pudieran fundamentar esos efectos nocivos. El presente trabajo se ha dirigido a la caracterización de posibles efectos de los EAAs sobre el sistema inmune y, más concretamente, sobre la funcionalidad de los linfocitos de timo y bazo, evaluando también la magnitud del efecto inhibidor de la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Para ello se estudiaron los efectos de dosis suprafarmacológicas (10 mg/kg/semana, por vía i.m., del orden de las que han venido siendo utilizadas de forma ilícita en medios deportivos) de dos EAAs con elevada relación anabólico androgénica que pertenecen a series estructurales diferentes, el decanoato de nandrolona (ND) y el estanozolol (ST). Para considerar posibles efectos diferenciales debidos a la interacción entre los tratamientos y diferentes tipos de entrenamiento, se estudiaron grupos de animales sedentarios y ejercitados en tapiz rodante siguiendo dos programas de entrenamiento, de tres meses de duración ambos, que diferían en intensidad y demanda metabólica, uno de alta intensidad y otro de intensidad moderada, con mayor componente aeróbico. El tratamiento con ND redujo la ganancia de peso corporal, inhibió la producción de testosterona, promovió una redistribución de las células inmunes del timo al bazo, redujo la movilidad de los linfocitos e inhibió de forma muy acusada la respuesta linfoproliferativa inducida por mitógeno. El tratamiento con ST no tuvo efectos sobre la ganancia de peso corporal, pero también inhibió la producción de testosterona de forma aún más acusada que el ND, indujo una redistribución de los linfocitos y modificó su actividad *in vitro*, aunque de forma menos acusada que el ND. La aplicación del programa de entrenamiento de alta intensidad redujo la movilidad y la proliferación de los linfocitos *in vitro* y el tratamiento simultáneo con esteroides anabolizantes agudizó todavía más estos efectos negativos sobre la funcionalidad de las células inmunes. Por el contrario, la aplicación del programa de entrenamiento de intensidad moderada, no afectó negativamente la funcionalidad de los linfocitos y normalizó en gran medida su actividad en los animales tratados con anabolizantes. Los datos que se presentan sugieren que el entrenamiento de intensidad moderada con elevado componente aeróbico, contrariamente al de alta intensidad, contrarresta los efectos aparentemente negativos de dosis elevadas de esteroides anabólico-androgénicos sobre la función linfocitaria. La existencia de una relación inversa entre la actividad del anabolizante como análogo de testosterona y la inhibición de la función linfocitaria sugiere que la inmunodepresión que parecen inducir las dosis suprafarmacológicas de los esteroides anabolizantes no depende del carácter androgénico del compuesto.

Palabras clave: Esteroides anabolizantes, decanoato de nandrolona, estanozolol, entrenamiento en tapiz rodante, sistema inmune, eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, función linfocitaria, ratas Wistar macho.

Abstract: Synthetic derivatives of sexual steroids that share with testosterone anabolic and androgenic activity that share anabolic and androgenic activity with testosterone (included as anabolic-androgenic steroids, AASs) are used in the sport context aimed at impro-

ving sport performance. Despite accumulated evidence that their use might be dangerous to health when administered at suprapharmacological doses for extended periods of time, there is little information about possible target cells and molecular mechanisms implicated in the presumed noxious effects of these compounds. We report here the results of an investigation directed towards the characterization of possible effects of AASs and exercise training on the functionality of thymus and spleen lymphocytes, using the rat as the experimental model and the degree of inhibition of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis as a measure of the testosterone agonist potential of the AAS. Application of a long-term, high-intensity program of treadmill running in male Wistar rats, reduced spontaneous mobility, chemotaxis, and the proliferative response after stimulation with Concanavalin A (Con A), of lymphocytes derived from thymus and spleen, while a lower intensity, endurance-directed program showed no negative effect. In sedentary animals, i.m. injections of nandrolone decanoate (ND) at 10 mg/kg/wk for 2 months, also reduced the mobility and the mitogen-induced proliferation in cell cultures of both lymphoid organs, the most prominent effect being an almost complete inhibition of the proliferative response in thymus-derived cells. Stanozolol (ST) also impaired lymphocyte function but less severely than ND. In ND-treated animals, the high-intensity training program further reduced the mobility and the proliferative response to Con A of spleen lymphocytes. The endurance-directed training program, however, counteracted the immunosuppressive effect observed in sedentary rats treated with anabolic steroids. The existence of an inverse relationship between the activity of the AAS as an inhibitor of the HPG-axis and the degree to which it inhibits lymphocyte function indicates that the AAS-induced immunosuppression does not exclusively depend upon their testosterone agonist character.

Key words: nandrolone decanoate, stanozolol, immune system response, lymphocyte activity, hypothalamus-pituitary-gonadal axis, long-term exercise training, male Wistar rats.

1. INTRODUCCION

La testosterona y otros andrógenos naturales, así como algunos derivados sintéticos de las hormonas sexuales que comparten con la testosterona las propiedades anabólicas y androgénicas, suelen agruparse bajo la denominación común de esteroides anabolizantes, o más correctamente esteroides anabólico-androgénicos. Estos compuestos son realmente heterogéneos y suelen agruparse en tres familias diferentes dependiendo de su afinidad estructural con los anillos del androstano, el androsteno o el estreno. La heterogeneidad estructural, y las posibles diferencias funcionales que de ello pueden derivarse, se hace todavía mucho mayor por la presencia de sustituyentes, modificaciones en los anillos, esterificación del grupo hidroxilo en C-17 y alquilaciones en este mismo átomo de carbono. A través de estas modificaciones se han conseguido compuestos resistentes a la degradación hepática que pueden aplicarse por vía i.m. y que se liberan lentamente de sus depósitos, lo que permite mantener niveles sanguíneos constantes y elevados durante periodos de varios días a semanas tras una sola aplicación. Por otro lado, además de interactuar con el receptor intracelular de andrógenos, los esteroides anabolizantes también son capaces de interactuar con otros receptores de hormonas esteroídicas e incluso con sitios diferentes de los receptores intracelulares clásicos. 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 biológicas pueden ser muy pronunciadas. 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, 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.

Los EAAs han venido siendo utilizados desde hace varias décadas para incrementar el tamaño del músculo y la capacidad de desarrollar fuerza. Más recientemente, el abuso de estos compuestos se ha extendido también a deportes en los que la resistencia aeróbica tiene un peso importante, asumiendo que los EAAs también incrementan la capacidad aeróbica. Sin entrar en la cuestión, todavía controvertida, de si los EAAs permiten una mejora del rendimiento deportivo en varones eugonadales por encima de lo que lo hace solamente el entrenamiento, se han ido acumulando evidencias que indican que los EAAs pudieran ser nocivos para la salud, particularmente por incrementar el riesgo de desarrollo de tumores. Una revisión de la literatura (realizada en el año 1984 por Haupt y Rovere) relativa a la administración de EAAs y el desarrollo de tumores en hígado, identificó 36 casos en los que podría establecerse esta relación. *Cinco carcinomas hepatocelulares y un adenoma hepático mejoraron al cesar la administración del EAA.* Como las hormonas esteroídicas, incluyendo los esteroides sexuales, tienen marcados efectos sobre el sistema inmune, la inducción de una inmunosupresión por la administración de los esteroides anabolizantes proporciona un posible mecanismo para justificar el riesgo incrementado de desarrollo de tumores.

La administración de EAAs para incrementar el rendimiento atlético tiene lugar en conjunción con el entrenamiento, y se ha descrito también que el entrenamiento es capaz de modular la función del sistema inmune. Inmediatamente después de la realización de un ejercicio suficientemente prolongado, se observa un efecto inmunomodulador transitorio y el entrenamiento de larga duración, a su vez, induce cambios persistentes en el sistema inmune. La realización regular de un ejercicio físico moderado suele asociarse a efectos beneficiosos sobre el sistema inmune, mientras que un ejercicio excesivo puede llevar a un estado de inmunodepresión,

asociado a una susceptibilidad incrementada a infecciones, lo que generalmente suele atribuirse a un sobreentrenamiento. Los mecanismos fisiológicos precisos que subyacen a los efectos del ejercicio sobre el sistema inmune no se conocen en sus detalles. Sin embargo, se conoce que algunas de las hormonas cuyos niveles séricos se modifican mucho por el ejercicio, tales como las catecolaminas, el cortisol (o corticosterona en la rata), insulina, ACTH, hormona de crecimiento y algunos neuropéptidos y citoquinas, tienen efectos notables sobre el estado del sistema inmune, lo que apoya la idea de que la modulación del sistema inmune por el ejercicio y los factores que a él se asocian, incluyendo el estrés físico, podrían venir mediados por hormonas.

En estos momentos todavía existe una información insuficiente sobre los efectos de los esteroides anabolizantes a las dosis de abuso, así como sobre los posibles mecanismos de transducción implicados en estas respuestas biológicas. La dificultad de dar respuestas claras a gran número de cuestiones relativas a los efectos biológicos de los esteroides anabolizantes, aunque sea utilizando sistemas 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 el estudio de las consecuencias que pueden derivarse de su utilización, tanto desde el punto de vista del rendimiento deportivo como del de la salud de los deportistas, constituya un problema de indudable interés científico y social. La inexistencia de respuestas científicas precisas a estas cuestiones se debe 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 experimentales en conjunción con diferentes anabolizantes esteroídicos y diferentes programas de entrenamiento, utilizando 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 interactúan con el receptor intracelular de andrógenos.

La investigación que se aborda en este trabajo pretende ofrecer información sobre los posibles efectos de los esteroides anabólico-androgénicos sobre el estado del sistema inmune, en relación con la manifestación de efectos inhibidores sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, haciendo hincapié en posibles diferencias en las respuestas biológica derivadas del tipo de anabolizante y del programa de entrenamiento en que se esté inmerso.

Objetivos. El presente trabajo se ha dirigido al estudio de los efectos sobre el sistema inmune, y más concretamente sobre la funcionalidad de los linfocitos de timo y bazo, de dosis suprafarmacológicas de esteroides anabolizantes que han sido ampliamente utilizados en medios deportivos con la intención de incrementar el rendimiento en la competición (el decanoato de nandrolona y el estanozolol), usando ratas Wistar macho como modelo experimental. En el desarrollo del trabajo 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 los 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, diri-

gido 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. 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 a la funcionalidad de las células inmunes, se han estudiado también los efectos de estos EAAs sobre el desarrollo corporal y sobre los niveles séricos de enzimas que suelen considerarse marcadoras de la integridad hepatocelular. Así mismo, se han evaluado los niveles de testosterona, para establecer la medida en que ambos compuestos inhiben el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y poder establecer una correlación con su efectividad sobre la actividad de células del sistema inmune.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 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, 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 (entrenamiento de resistencia aeróbica), 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 de 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 9 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 9 y las 12 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.

2.2 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.

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

	Semana (nº)	Duración (min.)	Vel. (m/min)	Pte (%)
Alta intensidad	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
Resistencia 1 aeróbica	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	

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.

2.3 Extracción y preparación de los tejidos

Al finalizar el programa de entrenamiento, 36 h (experimento en el que se aplicó el programa de entrenamiento de alta intensidad) o 48 h (experimento en el que se aplicó el programa de entrenamiento de resistencia aeróbica) 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 µl/100 g de peso corporal de una solución de 40 mg/ml de 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, tibial y sóleo), y extraer 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. Con la excepción del timo y el bazo que se procesaron inmediatamente para la obtención de los linfocitos, los restantes órganos se congelaron en nitrógeno líquido tras pasarlos por una solución salina fisiológica fría, secarlos por contacto con papel de cromatografía 3MM (Whatman) y pesarlos. Los tejidos congelados se conservaron a -80 °C hasta la realización de los análisis bioquímicos. 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 testosterona así como de otros metabolitos y actividades enzimáticas, que se realizaron por química seca utilizando un equipo Kodack Ektachem.

2.4 Ensayos de funcionalidad de los linfocitos

Tras la extracción en condiciones asépticas del timo y el bazo y su pesado, el tejido se fragmentó con unas tijeras y se pasó, presionándolo, a través de una malla (Sigma) para conseguir la disgregación de las células. El tejido disperso se centrifugó en un gradiente de Urograph-Ficoll (Schering y Sigma, respectivamente) con una densidad de partida de 1.070. El halo se resuspendió en solución salina tamponada, en la que se lavó tres veces. La respuesta del sistema inmune a los diferentes entrenamientos y/o tratamientos con EAAs se estudió indepen-

dientemente en células procedentes de ambos órganos linfoides. Cada una de las suspensiones celulares obtenidas de los dos órganos se dividió en dos alícuotas, la primera para medir la movilidad espontánea y la quimiotaxis y la otra para ensayar la linfoproliferación basal e inducida por mitógeno. La movilidad espontánea y la inducida (quimiotaxis) se determinaron por una modificación del método descrito originalmente por Boyden ya descrito en otros trabajos anteriores (de la Fuente y cols., 1993). Brevemente, la suspensión de linfocitos (0.3 ml de una suspensión de células que contenía 10^6 cel/ml) se depositó en el compartimento superior de una cámara con dos compartimentos separados entre sí por un filtro de membrana de $3 \mu\text{m}$ de diámetro de poro, mientras que en la cámara inferior se colocaron 0.4 ml de medio de cultivo (movilidad espontánea) o de medio conteniendo F-met-leu-phe (Sigma) a una concentración 10^{-6}M como quimioatrayente (quimiotaxis). Los resultados se expresaron como índices de movilidad o quimiotaxis, que representan en número total de linfocitos presentes en la parte inferior del filtro. La proliferación de los linfocitos se midió en condiciones basales y tras estimulación con el mitógeno concanavalina A ($1 \mu\text{g/ml}$, Con A, ICN Biomedicals) en cultivos realizados por triplicados, tres días después de haber preparado los cultivos, por incorporación de [^3H]Timidina (CEA, 0.5 mCi/placa), siguiendo el método descrito en trabajos anteriores (de la Fuente y cols., 1992). Los resultados se expresaron como incorporación en $\text{cpm}/10^6$ células.

2.5 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) 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 por regresión múltiple utilizando el programa estadístico MicroTSP (versión 6). 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 $p < 0.01$.

3. RESULTADOS

3.1 Efecto de los entrenamientos y del tratamiento con esteroides anabólico-androgénicos sobre el peso corporal y otros parámetros indicativos de efectos biológicos inducidos por ambos factores. La fig. 1 representa la ganancia de peso corporal en los diferentes grupos de los dos experimentos (en que se utilizaron programas de entrenamiento de diferente intensidad), considerando separadamente las primeras cuatro semanas (antes de que se inicie el tratamiento con los EAAs) y las últimas nueve semanas, durante las que se llevó a cabo el tratamiento con los anabolizantes. Tras las primeras cuatro semanas, los animales entrenados ganaron menos peso ($p < 0.05$, próximo a $p < 0.01$) que sus correspondientes controles sedentarios, independientemente del programa de entrenamiento aplicado. Durante las últimas nueve semanas, sin embargo, la ganancia de peso corporal fué similar en los grupos entrenados y en los sedentarios, lo que indica que las diferencias establecidas durante el primer mes de entrenamiento se mantuvieron pero no aumentaron de forma significativa. El tratamiento con una dosis suprafarmacológica de ND (10 mg/kg/semana) redujo de forma muy significativa la ganancia de peso corporal ($p < 0.01$), efecto que no se observó en los animales tratados con ST. El efecto del ND se apreció de forma casi inmediata tras iniciar el tratamiento, tanto en los animales sedentarios como en los entrenados. Los animales ejercitados tratados con ST ganaron menos peso ($p < 0.05$) que los sedentarios tratados, lo que constituye una interacción con el entrenamiento que no tiene lugar en los animales tratados con ND. La observación de que el ND, pero no el ST, induce un efecto renotrópico acusado (considerado indicativo de la actividad ana-

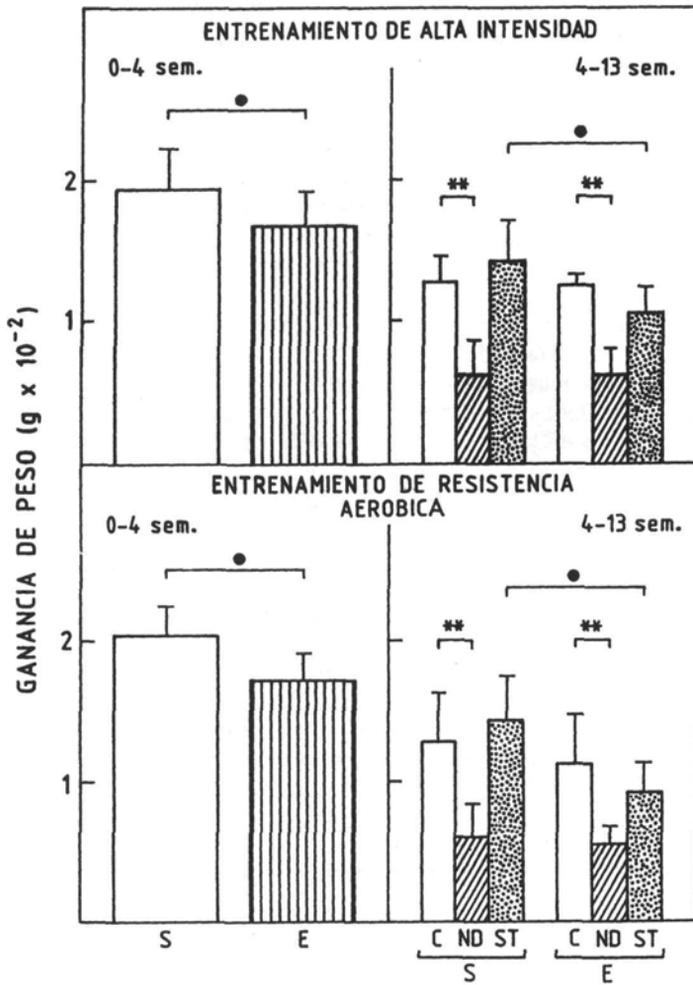


Figura 1. Efecto de la aplicación de dos programas de entrenamiento y/o de la administración de una dosis suprafarmacológica de decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST) sobre la ganancia de peso corporal. Durante las cuatro primeras semanas (0-4 sem) las ratas se encontraban agrupadas en animales sedentarios (S) y entrenados (E). El tratamiento con los esteroides anabolizantes se inició después de la cuarta semana y se prolongó hasta finalizar todo el programa de entrenamiento (4-13 sem). Después de la última sesión de entrenamiento, se dejaron descansar los animales de 36 a 48 h (según experimento). Los datos representan la media \pm desviación estándar, de n=14-16 animales/grupo en la parte izquierda de la figura y de n=4-6 animales/grupo en la parte derecha. **p<0,01, animales tratados frente a controles sin tratar; *p<0,05, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios. Tomado de Ferrández y cols., J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 59, 225-232, 1996.

bólica) e incrementa la relación entre el peso del corazón y el corporal (Fernández y col., 1995), también es consistente con la idea de que el tratamiento con ambos EAAs induce respuestas biológicas diferentes. De forma análoga, se ha observado (Fernández y cols., 1995 y Ferrández y cols., 1996) que el tratamiento independiente con cada uno de los EAAs reduce de forma pronunciada el peso del timo e incrementa de forma significativa el del bazo, lo que es indicativo de una redistribución de células entre ambos órganos linfoides. Ambos programas de en-

trenamiento indujeron una involución del timo. El peso de las adrenales también se redujo por el tratamiento con ambos EAAs. El entrenamiento de resistencia aeróbica, pero no el de alta intensidad, contrarresta el efecto de los esteroides anabolizantes normalizando el peso de las adrenales en los animales tratados (Fernández y cols, 1995 y Ferrández y cols., 1996).

3.2 Efectos de la administración de esteroides anabolizantes en individuos sedentarios y entrenados sobre los niveles séricos de testosterona y de enzimas marcadores de la integridad hepatocelular.

En la fig. 2 se representa el efecto de un tratamiento de 2 meses con una dosis suprafarmacológica (10 mg/kg/semana, inyección i.m. una vez por semana) de ND o ST, en animales sedentarios o sometidos al programa de entrenamiento de intensidad moderada de carrera en cinta rodante, sobre los niveles séricos de testosterona, utilizados como medida del efecto de los EAAs sobre la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. La aplicación del programa de entrenamiento incrementó en un 78 % ($p < 0.01$) los niveles estacionarios (medidos 48 h después de la última sesión de entrenamiento) de testosterona, lo que evidencia una activación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Como era de esperar, sin embargo, tanto el ND (hasta 60% y 29% del control en animales sedentarios y entrenados, respectivamente) como el ST (hasta el 26% y 9% del control sin en los animales sedentarios y entrenados, respectivamente) inhibieron la producción de testosterona de forma acusada, siendo estos efectos más pronunciados en los animales tratados con ST que en los tratados con ND, y en los ejercitados más que en los sedentarios. Estos datos indican que ambos esteroides anabolizantes, actuando como agonistas parciales de la testosterona, inhiben con diferente efectividad la producción de las gonadotropinas del lóbulo anterior de la hipófisis actuando por el mecanismo de retrocontrol que sirve para regular la homeostais de la testosterona.

Tabla 2. Niveles séricos de enzimas marcadoras de la integridad hepatocelular en ratas sedentarias o sometidas a un programa de entrenamiento en tapiz rodante de tres meses de duración, dirigido al incremento de la capacidad aeróbica, en ausencia de tratamiento (control) o tras administración de una dosis semanal de 10 mg/kg de decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST), durante los dos últimos meses.

	SEDENTARIOS			ENTRENADOS		
	CONTROL	ND	ST	CONTROL	ND	ST
AST (1)	98 ± 20	92 ± 3	111 ± 18	102 ± 16	150 ± 29**	194 ± 65**
ALT (1)	62 ± 4	58 ± 5,6	61 ± 9	51 ± 4*	51 ± 4,8*	41 ± 15*
ChE (1)	0,36 ± 0,07	0,24 ± 0,03*	0,26 ± 0,05*	0,37 ± 0,08	0,38 ± 0,05*	0,38 ± 0,06*

(1) Las actividades se dan en U/l excepto para la ChE que se dan en U/ml. Se representan las medias ± desviación estándar de datos de 4-6 animales/grupo. ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; ChE, colinesterasa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ Tratados frente a los correspondientes sin tratar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ entrenados frente a sedentarios.

Para evaluar la integridad hepatocelular, en los seis grupos de animales correspondientes al experimento en que se aplicó el programa de entrenamiento de intensidad moderada, se mi-

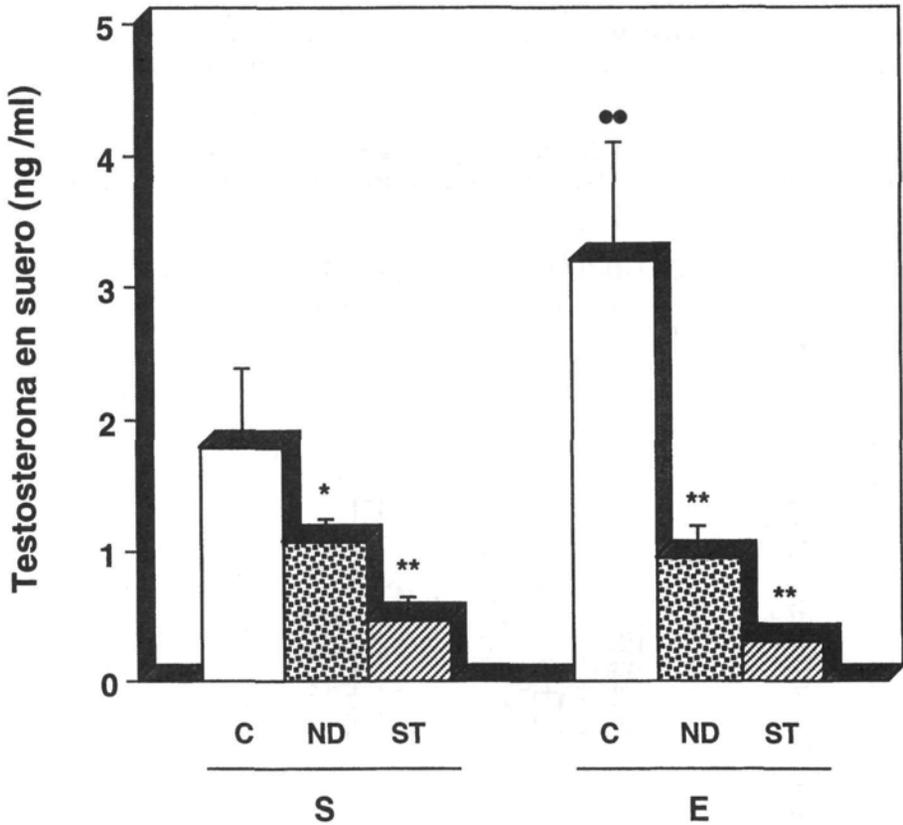


Figura 2. Efecto de la administración por separado de una dosis suprafarmacológica de los esteroides anabólico-androgénicos decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST) y/o plicación de un programa de entrenamiento de intensidad moderada, dirigido a incrementar la capacidad respiratoria sobre la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. El tratamiento con los esteroides anabolizantes se inició después de la cuarta semana de iniciarse el programa de entrenamiento de 3 meses de duración y se prolongó hasta su finalización. Para medir niveles estacionarios, después de la última sesión de entrenamiento, se dejaron descansar los animales durante 48 h antes de la extracción de sangre y preparación del suero en el que se determinaron los niveles de testosterona. Los datos representan la media \pm desviación estándar, de $n=4-6$ animales/grupo. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, animales tratados frente a controles sin tratar; * $p<0,01$, animales entrenados frente a los correspondientes sedentarios.

dieron los niveles séricos de varias enzimas consideradas marcadoras de daños en las células hepáticas (tabla 2). Ninguno de los dos EAA incrementó los niveles séricos de las enzimas marcadoras, colinesterasa (ChE) y alanina (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). Por el contrario, los niveles séricos de ChE se redujeron significativamente tanto por el tratamiento con ND (67% del control, $p<0,05$) como por ST (72% del control, $p<0,05$) en los animales sin entrenar, pero no en los entrenados. Así pues, el entrenamiento (o, al menos, el entrenamiento de intensidad moderada utilizado en este experimento) contrarresta el efecto de los EAA que conduce a la presencia de niveles reducidos de ChE en el suero. Este entrenamiento redujo los niveles de ALT (hasta 82% los del control, $p<0,01$), prácticamente de forma independiente de la presencia de esteroides anabolizantes. Ambos tratamientos (ND 163%, $p<0,05$; ST 174%, $p<0,01$), sin embargo, incrementaron los niveles séricos de la aspartato aminotransfe-

rasa (AST), aunque solamente en los animales entrenados. La posible significación biológica de estos cambios dispares de los niveles séricos de dos enzimas que suelen considerarse indicadoras de la integridad hepatocelular permanece aún por establecer.

3.3 Efecto de la aplicación de dos programas de entrenamiento de intensidad diferente y de la administración de EAAs sobre la movilidad espontánea e indu-

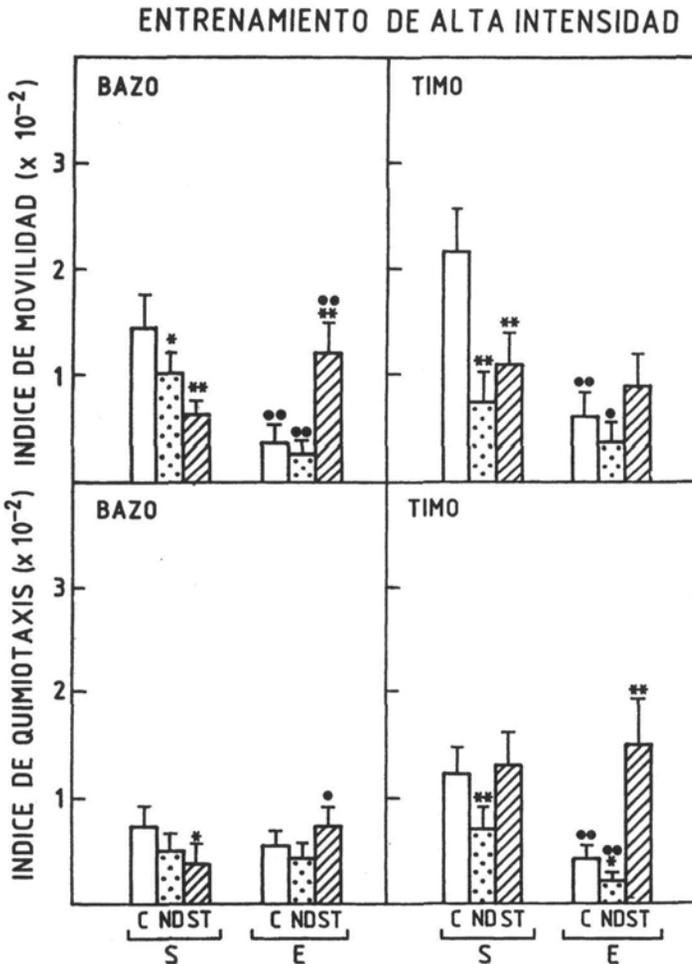


Figura 3. Efecto del tratamiento con decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST) y/o del entrenamiento de alta intensidad sobre la movilidad espontánea y la quimiotaxis de células linfáticas procedentes de timo o bazo. En las células procedentes del timo o bazo, se analizó la movilidad espontánea y la quimiotaxis en una cámara Boyden, tal y como se indica en materiales y métodos. La figura representa la media \pm desviación estándar (n=4-6) del número total de linfocitos encontrados en la cara inferior de la membrana, en determinaciones por duplicado, de animales sedentarios (S) o entrenados siguiendo el programa de entrenamiento de alta intensidad (E). C, control; ND, decanoato de nandrolona; ST, estanozolol. *p<0,05, **p<0,01, animales tratados frente a controles sin tratar; *p<0,05, **p<0,01, animales entrenados frente a los grupos sedentarios correspondientes. Tomado de Ferrández y cols., J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 59, 225-232, 1996.

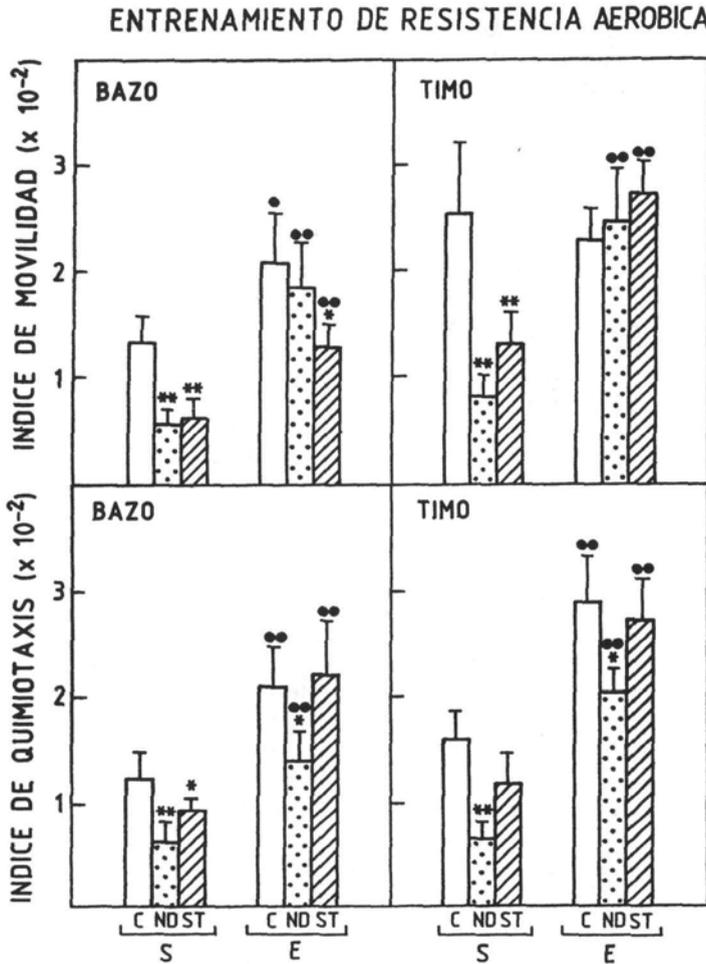


Figura 4. Efecto del tratamiento con decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST) y/o del entrenamiento de resistencia aeróbica sobre la movilidad espontánea y la quimiotaxis de células linfáticas procedentes de timo y bazo. Para más detalles véase la leyenda de la fig. 2. Los datos representan la media \pm desviación estándar de 4-6 animales/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales tratados frente a controles sin tratar; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales entrenados frente a los grupos sedentarios correspondientes. Tomado de Ferrández y cols., J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 59, 225-232, 1996.

cida de linfocitos de timo y bazo. Las figuras 3 y 4 resumen los datos que representan los efectos de la aplicación de dos programas de entrenamiento de intensidad diferente, y del tratamiento con una dosis suprafarmacológica de 10 mg/kg/semana de los esteroides anabolizantes ND o ST, sobre la movilidad espontánea y la quimiotaxis de linfocitos procedentes de timo y de bazo. En ambos experimentos, los índices de movilidad y quimiotaxis se redujeron de forma significativa en los linfocitos de bazo, y de forma muy significativa en los procedentes de timo, como consecuencia del tratamiento con ND. Un efecto similar se observó para los animales tratados con ST.

La aplicación del programa de entrenamiento de alta intensidad también redujo la movilidad espontánea e inducida de los linfocitos (fig. 3). La administración de ST, pero no la de ND, antagoniza parcialmente los efectos aparentemente inhibitorios del programa de entrenamiento de alta intensidad sobre la movilidad de los linfocitos. Resulta interesante la observación de que la aplicación del programa de entrenamiento dirigido al incremento de la capacidad aeróbica estimuló los índices de movilidad espontánea y de quimiotaxis de los linfocitos por encima de los valores presentes en los controles sin tratar y restableció la movilidad normal de los linfocitos en los animales tratados con EAAs (fig. 4).

3.4 Efecto de la aplicación de dos programas diferentes de entrenamiento en cinta rodante y de la administración por separado de dos EAAs sobre la respuesta proliferativa basal y la inducida por la concanavalina A, de linfocitos de timo y bazo.

La evaluación de la función linfocitaria tras el ejercicio se ha realizado frecuentemente midiendo la respuesta proliferativa de los linfocitos cultivados *in vitro* tras una estimulación por lectinas vegetales tales como la fitohemaglutinina o la concanavalin A (Con-A). Las figuras 5 y 6 resumen los efectos de los tratamientos con una dosis suprafarmacológica (10 mg/ml/semana, inyectada i.m. una vez por semana) de ND o ST sobre la actividad proliferativa basal y la inducida por Con-A en linfocitos procedentes de timo y bazo, en ratas sedentarias o entrenadas. En los animales sedentarios el tratamiento con EAAs redujo considerablemente la respuesta linfoproliferativa. Este efecto se manifestó de forma acusada en las células procedentes del timo de los animales tratados con ND en los que la relación de proliferación estimulada por Con-A a basal fue menos del 10% de la determinada para los controles sin tratar (fig.5). En células de bazo el estanozolol inhibió la proliferación de linfocitos inducida por mitógeno todavía en mayor medida que el ND (fig 6), aunque la relación entre los valores de linfoproliferación inducida a la basal sea en este caso mayor que la del ND, debido a los mayores niveles de proliferación basal que se observan en los linfocitos de bazo de animales tratados con ND.

El entrenamiento de elevada intensidad incrementó la linfoproliferación basal y redujo la estimulada por Con A de forma muy significativa, por lo que las relaciones de linfoproliferación inducida por Con A a basal se redujeron mucho en las células de ambos órganos linfoides (figs. 5 and 6). Contrastando con estos datos, la aplicación del programa de entrenamiento de intensidad moderada, dirigido a incrementar la capacidad respiratoria, no tuvo efectos negativos sobre la linfoproliferación según puede deducirse del mantenimiento de las relaciones de linfoproliferación estimulada por Con A a basal (fig.5)

En las células de timo de animales tratados con ND, la aplicación del programa de entrenamiento de alta intensidad incrementó tanto la proliferación basal de los linfocitos (unas 3 veces) como la inducida por Con-A (unas 6 veces), lo que da como resultado una relación entre la linfoproliferación inducida por Con-A y la basal de aproximadamente el doble de la determinada para animales sedentarios (fig. 5). En las células correspondientes de bazo, la proliferación basal se incrementó en unas cinco veces mientras que la proliferación estimulada por Con-A se redujo a aproximadamente el 50% como consecuencia de la aplicación de este programa de entrenamiento, por lo que la relación de linfoproliferación inducida por Con-A a basal se redujo unas 10 veces (fig. 6). Un efecto similar, aunque menos intenso, se puso también de manifiesto en los animales tratados con estanozolol sometidos al programa de entrenamiento de alta intensidad.

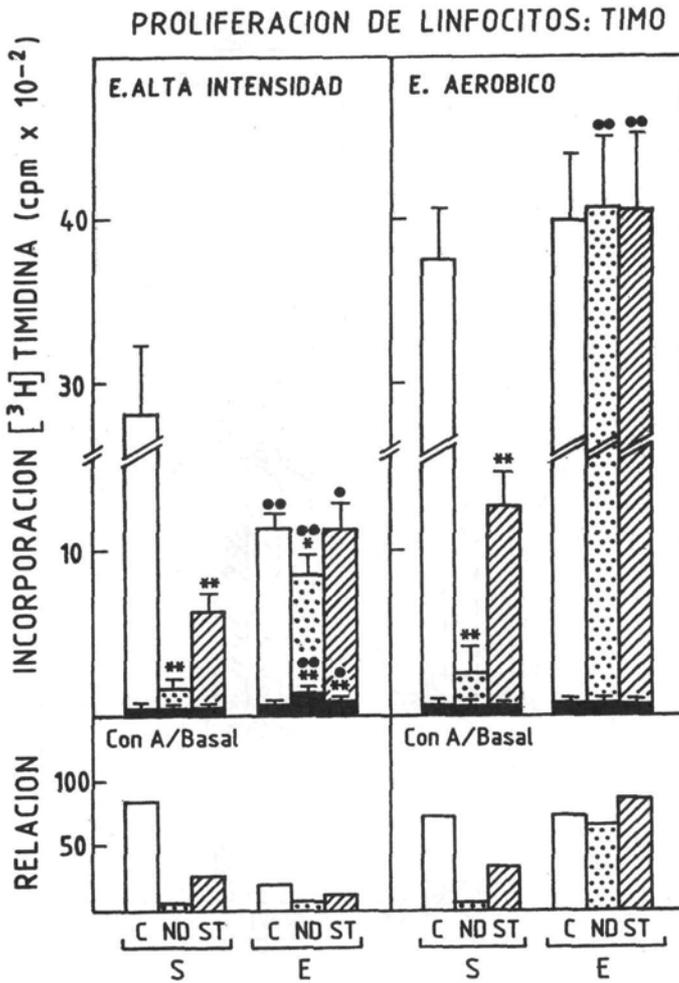


Figure 5. Efecto de la aplicación por separado de dos programas de entrenamiento y/o administración de dos esteroides anabolizantes diferentes sobre la respuesta linfoproliferativa basal o estimulada por Con A en células procedentes de timo. Triplicados de cultivos de células linfáticas procedentes de timo se incubaron durante 24 h con 0,5 mCi de $[^3\text{H}]$ timidina después de haber sido estimuladas durante 48 h con 1 mg/ml de Concanavalina A (Con A) o sin estimulación por el mitógeno (basal). La figura representa la media \pm desviación estándar ($n=4-6$) de la radiactividad incorporada en cultivos de linfocitos no estimulados (columna inferior insertada, en negro) o tras estimulación con el mitógeno Con A, procedentes de ratas sedentarias (S) o entrenadas (E) siguiendo dos programas de entrenamiento diferentes en ausencia de tratamiento (C) o después de la administración de decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST) a una dosis de 10 mg/kg/wk durante los dos últimos meses. En la parte inferior de la figura se representa también la relación de incorporaciones en los cultivos estimulados y basales. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, animales tratados frente a controles sin tratar; $p<0,05$, $p<0,01$, animales entrenados frente a los correspondientes grupos sedentarios. Tomado de Ferrández y cols., J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 59, 225-232, 1996.

En contraste con los resultados comentados anteriormente referidos al programa de entrenamiento de alta intensidad, tras aplicación del programa de entrenamiento dirigido a incrementar la capacidad respiratoria a animales tratados con ND, la proliferación estimulada

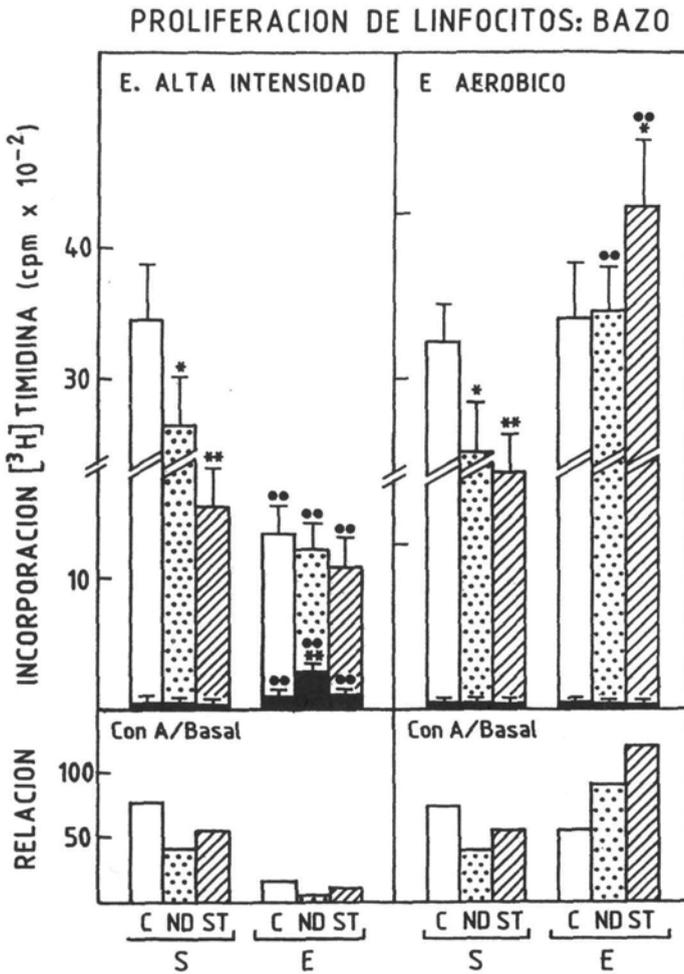


Figura 6. Evaluación de la linfoproliferación en cultivos de células linfáticas procedentes de bazo de ratas sometidas por separado a dos programas de entrenamiento diferentes en ausencia de tratamientos o tras administración de una dosis suprafarmacológica de decanoato de nandrolona (ND) o estanozolol (ST). La proliferación de los linfocitos se evaluó en cultivos de células linfáticas procedentes de bazo. Para más detalles véase la leyenda de la fig. 4 y la sección de materiales y métodos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales tratados frente a controles sin tratar; $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animales entrenados frente a los correspondientes grupos sedentarios. Tomado de Ferrández y cols., J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 59, 225-232, 1996.

por Con-A de los linfocitos procedentes de timo (y la relación resultante de proliferación inducida por Con A a basal) aumentó en unas 15 veces, lo que es una respuesta proliferativa similar a la de los animales ejercitados sin tratar (y unas 10 veces la de los animales tratados con ND que siguieron el programa de entrenamiento de alta intensidad). En las células de bazo de los animales tratados con ND, la respuesta proliferativa también se normalizó al aplicar el programa de entrenamiento de intensidad moderada dirigido a aumentar la capacidad respiratoria (fig. 5). Los linfocitos de timo y bazo de animales tratados con ST también recuperaron la respuesta proliferativa normal al apli-

car el regimen de entrenamiento moderado. En el caso de las células de bazo de animales tratados con ST que siguieron este programa de entrenamiento la respuesta proliferativa incluso aumentó con respecto a la de los animales sedentarios sin tratar.

4. DISCUSIÓN

Las conclusiones de un cierto número de casos clínicos y otras publicaciones de datos anecdóticos a lo largo de los últimos 10-15 años han contribuido a extender la idea de que la administración de dosis suprafarmacológicas de EAAs puede tener consecuencias negativas para la salud. A la vista del uso aparentemente amplio de los EAAs en los medios deportivos, hemos considerado de interés analizar sus efectos sobre la actividad de las células inmunitarias cuando se administran a dosis suprafarmacológicas que se encuentran en el rango de las dosis que se sabe son objeto de abuso en el contexto deportivo. Como consecuencia del hecho de que el uso de esteroides anabolizantes no está permitido, se tiene una información muy limitada sobre las dosis y patrones de administración a los atletas. Frecuentemente se administran varios esteroides anabolizantes de forma conjunta, lo que puede resultar en dosificaciones de 10 a 100 veces superiores a las recomendadas como terapia de reposición, siguiendo un esquema de administración en pirámide. Debido a la gran diversidad de combinaciones, dosis y patrones de aplicación, no resulta posible seleccionar un protocolo de laboratorio que pueda considerarse representativo de los métodos de administración de EAAs en los medios deportivos, por lo que se consideró preferible analizar comparativamente los efectos de dos compuestos puros sobre la función linfocitaria y la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, aún cuando ello no refleje exactamente las condiciones de abuso por esteroides. Por razones obvias, hemos utilizado un modelo animal para estudiar los efectos biológicos de los EAAs a dosis suprafarmacológicas, lo que introduce una limitación a la hora de interpretar las conclusiones resultantes del estudio. Sin embargo, por otro lado, el modelo de ratas corredoras permite el estudio de grupos homogéneos de individuos en condiciones controladas, que sería muy difícil de conseguir, si no imposible en estudios realizados con humanos.

Usando este modelo, hemos examinado los efectos de la administración de una dosis suprafarmacológica de dos esteroides anabolizantes en individuos sedentarios y entrenados, siguiendo dos programas diferentes de entrenamiento, sobre la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y la funcionalidad in vitro de los linfocitos. La respuesta proliferativa tras adición de mitógenos es considerada indicativa de la actividad de los linfocitos in vivo y se ha utilizado frecuentemente para analizar los efectos del ejercicio sobre el sistema inmune. La movilidad, otro de los parámetros medidos en este trabajo, es también una propiedad relevante de los linfocitos. La movilidad dirigida (quimiotaxis), el primer y trascendental suceso de la respuesta inmune, apenas se ha aplicado en estudios relacionadas con el ejercicio.

Los resultados de este trabajo indican que la aplicación de un régimen de ejercicio de alta intensidad, pero no la aplicación de un programa de entrenamiento moderado, dirigido al incremento de la capacidad aeróbica, tiene un efecto negativo sobre la movilidad y respuesta proliferativa de los linfocitos procedentes de timo y bazo y mantenidos en cultivo. Este resultado es consistente con la idea de que la realización de una actividad física moderada es beneficiosa para la actividad de las células del sistema inmune,

mientras que el ejercicio extenuante, excesivamente intenso o difícilmente tolerado por el individuo puede comportarse como un inmunosupresor. El ejercicio de alta intensidad aumentó la proliferación basal y redujo la estimulada por Con A en los linfocitos de timo y bazo, con respecto a las de los controles sedentarios. Como el sacrificio se realizó con un lapso de tiempo mayor de un día desde la realización de la última sesión de entrenamiento, parece improbable que la inhibición de la respuesta de las células inmunes en los animales sometidos al entrenamiento de alta intensidad sea consecuencia de una modificación transitoria asociada a la ejecución del ejercicio físico, tal como un aumento de los niveles de catecolaminas, esteroides corticales, péptidos opiáceos o prostaglandinas, por mencionar algunos de los factores que se ha publicado que son capaces de reducir la respuesta mitogénica de los linfocitos en el periodo inmediato a la realización del ejercicio. Parece mucho más probable que este efecto sea consecuencia de un proceso de adaptación o, al revés, el resultado de una acumulación de alteraciones que se fueron produciendo a lo largo del periodo de entrenamiento como consecuencia de la imposibilidad de mantener la homeostasis durante la ejecución del ejercicio. Resulta tentador especular con la posibilidad de que esta inhibición de la respuesta de las células inmunes sea reminiscente del "síndrome de sobreentrenamiento" que se ha detectado en atletas de élite y que se caracteriza por una disfunción de las células del sistema inmune que tiene como consecuencia la manifestación recurrente de infecciones.

Las catecolaminas, y la adrenalina en particular, parecen ejercer efectos importantes sobre las células del sistema inmune, pudiendo ser responsables de varios de los efectos desencadenados por el ejercicio agudo y el estrés psicológico (Hoffman-Goetz y Pedersen, 1994). Las diferencias observadas en los efectos de los dos tipos de entrenamiento sobre la función linfocitaria podrían ser consecuencia de las diferencias en su intensidad y demanda metabólica, ya que estos factores parecen tener un papel crítico en la regulación del número de receptores adrenérgicos presentes en la membrana del eritrocito.

Se ha comprobado que la administración de decanoato de nandrolona o estanozolol a una dosis suprafarmacológica de 10 mg/kg de peso corporal (comprendida en el rango de concentraciones que se sabe son utilizadas de forma fraudulenta por algunos deportistas con la intención de incrementar el rendimiento en la competición) inhibe la actividad de los linfocitos *in vitro*, particularmente en los timocitos. Usando linfocitos humanos circulantes cultivados *in vitro* se ha observado que las hormonas sexuales son capaces de inducir un efecto inmunoregulador directo (Grossman, 1985; Sthoeger y cols., 1988), lo que podría contribuir a explicar los efectos de las dosis suprafarmacológicas de EAA sobre las células inmunes, aunque también se han publicado trabajos en los que no se ha podido poner de manifiesto un efecto de los andrógenos sobre la actividad linfocitaria (Ansar y cols., 1985).

El mecanismo por el que los esteroides anabólico-androgénicos a dosis suprafarmacológicas modifican la actividad celular es difícil de determinar ya que bajo esta denominación común se engloba un gran número de compuestos heterogéneos. En primer lugar por estar relacionados con los anillos del androstano, del androsteno o del estreno, y además por su diversificación adicional por la inclusión de sustituyentes y modificaciones de la estructura del anillo policíclico. Por ello, cabe esperar que los diferentes EAA tengan un comportamiento individualizado sobre el metabolismo celular en función de sus afinidades de unión al receptor de andrógenos, a la posibilidad de interactuar con otros receptores de hormonas esteroídicas e incluso a su capacidad de

interaccionar con estructuras diferentes de los receptores de hormonas esteroídicas. Se ha puesto de manifiesto que el efecto inmunosupresor que induce la testosterona en la autocuración de infecciones de malaria en modelos animales no parece implicar de forma primaria ni al receptor de andrógenos ni al de estrógenos y, el estradiol actuó como inmunosupresor, a dosis de solamente el 1% las de testosterona, a través de una interacción con el receptor de estrógenos. Los esteroides anabolizantes estudiados en este trabajo, el decanoato de nandrolona (éster de la 19-nortestosterona, que se sabe se une al receptor de andrógenos con más afinidad que la testosterona) y el estanozolol, relacionado con la 4,5-dihidrotestosterona (un derivado de testosterona que es de 2 a 6 veces más activo como anabolizante que esta hormona), están estrechamente relacionados con el principal andrógeno natural y parece probable que inicien parte de sus respuestas celulares interaccionando con el receptor de andrógenos. Sin embargo, como consecuencia de las peculiaridades estructurales, las concentraciones a que se utilizan, y la posible actividad biológica de algunos de sus productos metabólicos, también es posible que algunos de sus efectos biológicos dependan de interacciones con otros receptores de hormonas esteroídicas, muy particularmente los receptores de estrógenos y de glucocorticoides. Como se indica aquí, la administración de dosis elevadas de decanoato de nandrolona redujo la ganancia de peso corporal tanto en los animales sedentarios como en los entrenados, un efecto que no era de esperar para un compuesto que actúe solamente como sustancia anabolizante. Por otro lado, también a diferencia del estanozolol, el decanoato de nandrolona incrementó significativamente la relación entre el peso del corazón y el corporal, un efecto que también se sabe que ocurre como respuesta al entrenamiento y a la administración de glucocorticoides. Cuando estos datos se analizan de forma conjunta, teniendo en cuenta los efectos inmunoreguladores descritos para los glucocorticoides y los esteroides sexuales, se plantea la cuestión de si los efectos del decanoato de nandrolona sobre la función linfocitaria también son debidos en parte a una interacción con los receptores de otras hormonas esteroídicas diferentes del receptor de andrógenos. Basándose en la interacción de los EAA con el receptor de glucocorticoides (Mayer y Rosen, 1975), se ha propuesto que los esteroides anabolizantes pueden ejercer un efecto anabolizante actuando como compuestos anticatabólicos (antagonizando a los glucocorticoides), aunque sobre esta interpretación existe una fuerte controversia (Hickson y cols., 1990).

Finalmente, los cambios que se producen en la masa del timo y el bazo provocados por tratamiento prolongado con dosis suprafarmacológicas de decanoato de nandrolona y estanozolol, indican que los esteroides anabolizantes puede interferir el control de la migración y el ensamblaje de los linfocitos en diversos compartimentos corporales, como ocurre también con el ejercicio. Los corticoesteroides median los efectos de numerosos estímulos fisiológicos (incluyendo en buena parte los del ejercicio crónico) sobre el reclutamiento y retención de linfocitos en diversos compartimentos, y su administración exógena a dosis suprafarmacológicas induce una involución del timo (Madden y Felten, 1995). Un efecto opuesto, de carácter irreversible puede ponerse de manifiesto tras gonadectomía tanto en machos como en hembras.

5. CONCLUSIONES FINALES

De los datos que aquí se presentan puede concluirse que la administración de dosis suprafarmacológicas de esteroides anabolizantes durante periodos prolongados de tiempo afecta negativamente a la funcionalidad de los linfocitos de timo y bazo culti-

vados in vitro. El ejercicio regular de intensidad moderada, contrariamente al entrenamiento de alta intensidad, parece contrarrestar los efectos aparentemente negativos de dosis elevadas de esteroides anabólico-androgénicos sobre la función linfocitaria por un mecanismo de acción todavía desconocido. El decanoato de nandrolona, que tiene efectos más acusados que el estanozolol sobre la función de los linfocitos de timo y bazo, inhibió menos la actividad del eje hipotálamo hipofisario-gonadal que el estanozolol; lo que evidencia que no existe una correlación entre la capacidad de actuación como inmunodepresor y el carácter androgénico. Una mayor profundización en los efectos de los EAAs sobre el sistema inmune exige la realización de experimentos adicionales para caracterizar otros efectos sobre la respuesta inmune celular y humoral, así como para identificar las moléculas que actúan realmente como señalizadoras de esta respuesta, los lugares de recepción en las células inmunes, y el carácter agonista o antagonista de la(s) interacción(es).

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a E. Fernández por su colaboración en el desarrollo de los experimentos en las etapas iniciales del trabajo, a M. Pérez Martínez y N. Jiménez por su colaboración en la aplicación de los programas de entrenamiento y a Javier Palacín por su ayuda en el cuidado y tratamiento de los animales. 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. Parte de los datos presentados en este trabajo han sido publicados en la revista *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 59:225-232, 1996. 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.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALEN, M. Androgenic steroid effects on liver and red cells. *Br. J. Sports Med.* 19:15-22, 1985.
- ANSARA S., PENHALE W.J. y TALAL N.: Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. *Am. J. Pathol.* 121:531-551, 1985.
- ATHREYA B.H., PLETCHER J., ZULIAN F., WEINER D.B. y WILLIAMS W.V.: Subset-specific effects of sex hormones and pituitary gonadotropins on human lymphocyte proliferation in vitro. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 66:201-211, 1993.
- BARTSCH, W., M. KRIEG, y K.D. VOIGT. Regulation and compartmentalization of androgens in rat prostate and muscle. *J. Steroid Biochem.* 19:929-937, 1983.
- BARBIERI, R.L., H. LEE, y K.J. RYAN. Danazol binding to rat androgen, glucocorticoid, progesterone, and estrogen receptors: Correlation with biological activity. *Fertil. Steril.* 31:182-186, 1979.
- BATES, P.C., L.F. CHEW, y D.J. MILLWARD. Effects of the anabolic steroid stanozolol on growth and protein metabolism in the rat. *J. Endocrinol.* 114:373-381, 1987.
- BENTEN W.P., WUNDERLICH F., HERRMANN R. y KUHN-VELTEN W.N.: Testosterone-induced compared with estradiol-induced immunosuppression against *Plasmodium chabaudi* malaria. *J. Endocrinol.* 139:487-494, 1993.

- BERGINK, E.W., P.S.L.JANSSEN, E.W. TURPIJN, y 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.
- BOYDEN S.V.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115:453-458, 1962.
- BUNT J.C.: Hormonal alterations due to exercise. *Sports Medicine* 3:331-345, 1986.
- BUTTERY, P.J., y B.G. VERNON. Protein metabolism in animals treated with anabolic agents. *Vet. Res. Commun.* 7:11-17, 1983.
- CELOTTI, F., y 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.
- Council of Scientific Affairs, American Medical Association. Medical and nonmedical uses of anabolic-androgenic steroids. *JAMA* 264:2923-2927, 1992.
- COX J. y FORD W.: The migration of lymphocytes across specialized vascular endothelium. IV. Prednisolone acts at several points on the recirculation pathways of lymphocytes. *Cell Immunol.* 66:407-422, 1982.
- DE LA FUENTE M., FERRÁNDEZ M.D., MUÑOZ F., DE JUAN E. y MIQUEL J.: Stimulation by the antioxidant thioprolin of the lymphocyte functions of old mice. *Mech. Ageing Develop.* 68:27-36, 1993.
- DE LA FUENTE M., FERRÁNDEZ 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.* 65:177-186, 1992.
- 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.
- EVANS, W. J., y J. L. IVY. Effects of testosterone propionate on hindlimb-immobilized rats. *J. Appl. Physiol.* 52:1643-1647, 1982.
- EXNER, G.U., H.W. STAUDTE, y D. PETTE. Isometric training of rats. Effects upon fast and slow muscle and modification by an anabolic hormone (nandrolone decanoate). II. Male rats. *Pfluegers Arch.* 345:15-22, 1973.
- FERNÁNDEZ, E., HERNANDO, R., DÍAZ, A.E. y R. MANSO. Efectos tróficos e interacción con el entrenamiento de agonistas hormonales anabolizantes: I. Esteroides anabólico androgénicos. En: *Adaptación hormonal al entrenamiento. Investigaciones en Ciencias del Deporte* 2:7-31, 1995.
- FERRÁNDEZ, M.D., DE LA FUENTE, M., FERNÁNDEZ, E., y R. MANSO. Anabolic steroids and lymphocyte function in sedentary and exercise-trained rats. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 59:225-232, 1996.
- FITZGERALD L.: Overtraining increases the susceptibility to infections. *Int. J. Sports Med.* 12 (Suppl. 1):5-8, 1991.
- FREY M. J., MANCINI D., FISCHBERG, D., WILSON J. R. y MOLINOFF. P. B.: Effect of exercise duration on density and coupling of beta-adrenergic receptors on human mononuclear cells. *J. Appl. Physiol.* 66:1494-1500, 1989.
- GRIGGS, R.C., W. KINGSTON, R.F. JEZEFOWICZ, B.E. HERR, G. FORBES, y D. HALLIDAY. Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis. *J. Appl. Physiol.* 66:498-503, 1989.
- GROSSMAN, C.J.: Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 227:257-261, 1985.
- HAUPT, H.A., y G.D. ROVERE. Anabolic steroids: A review of the literature. *Am. J. Sports Med.* 12:469-483, 1984.

- HICKSON, R.C., S.M. CZERWINSKI, M.T. FALDUTO, y A.P. YOUNG. Glucocorticoid antagonism by exercise and androgenic-anabolic steroids. *Med. Sci. Sports Exerc.* 22:331-340, 1990.
- HOFFMAN-GOETZ L. y PEDERSEN B.K.: Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Immunology Today* 15:382-387, 1994.
- HOLMA, P. Effect of an anabolic steroid (metandienone) on central en periperal bood flow in well-trained male athletes. *Ann. Clin. Res* 9:215-222, 1977.
- KEAST D., Cameron K. y MORTON A.R.: Exercise and the immune response. *Sports Medicine.* 5:248-267, 1988.
- KOOCHAKIAN, C.D., HUMM, J.H., y BARTLETT, M.N. Effect of steroids on the body weight, temporal muscle and organs of the guinea pig. *Am. J. Physiol.* 155:242-249, 1948.
- KOPERA, H. The history of anabolic steroids and a review of clinical experience with anabolic steroids. *Acta Endocrinol.* 110 (Suppl. 271):11-18, 1985.
- KUHN, F. E., y S. R. MAX. Testosterone and muscle hypertrophy in female rats. *J. Appl. Physiol.* 59:24-27, 1985.
- KUIPERS H. y H.A. KEIZER. Overtraining in elite athletes. *Sport. Med.* 6:79-92, 1988.
- LAMB, D.R. Anabolic steroids and athletic performance. In: *Hormones and Sport. Sero-no Symposia vol. 55*, New York, Raven Press, 1989, pp. 257-273.
- LOEB, J. N. Corticosteroids and growth. *N. Engl. J. Med.* 295:547-552, 1976.
- LUKAS, S.E. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 61-68, 1993.
- MACKINNON L.T.: Exercise and immunology. Human Kinetics Books, Champaign, IL. (1992) pp 1-113.
- MCCARTHY D.A. y DALE M.M.: The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sport Med.* 6:333-363, 1988.
- MADDEN K. S. y FELTEN D.L.: Experimental basis for neural-immune intereactions. *Physiol. Rev.* 75 (1995) 77-106.1.
- MANSO, R. Actividad biológica y mecanismo de acción de los esteroides anabólico-androgénicos. *Arch. Med Dep.* 28:373-384, 1990.
- MAYER, M., y F. ROSEN. Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol. *Am. J. Physiol* 229:1381-1386, 1975.
- MIRAND, E.A., A.W. GORDON, y J. WENIG. Mechanism of testosterone action in erithropoiesis. *Nature* 206:270-272, 1965.
- MOORADIAN, A. D., J. E. MORLEY, y S.G. KORENMAN. Biological actions of androgens. *Endocrine Rev.* 8:1-28, 1987.
- 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.
- MORANO, I., y 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.
- NEHLSSEN-CANNARELLA S.L., NIEMAN D.C., BALK-LAMBERTON A.J. et al.: The effects of moderate exercise training on immune response. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23:64-70, 1991.
- NIEMAN, D.C.: Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26:128-139, 1994.
- OTTAWAY C.A. y HUSBAND A.J.: The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol. Today* 15:511-517, 1994.
- PAAVONEN T.: Hormonal regulation of immune responses. *Ann. Med.* 26:255-258, 1994.

- RAAKA, B.M., M. FINNERTY, y 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.
- ROCHFERT, H., y M. GARCÍA. The estrogenic and antiestrogenic activities of androgens in female target tissues. *Pharmac. Ther.* 23:193-216, 1984.
- ROGOZKIN, V.A. *Metabolism of Anabolic Androgenic Steroids*; Boca Raton, Florida; CRC Press; 1991.
- SAARTOK T., DAHLBERG F. y GUSTAVSSON J.-A.: Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globuline. *Endocrinology* 114:2100-2106, 1984.
- SHEPHARD, R.J., D. KILLINGER, y T. FRIED. Responses to sustained use of anabolic steroids. *Br. J. Sports Med.* 11:170-178, 1977.
- SCHUURS A.H. y VERHEUL A.H.: Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid Biochem.* 35:157-172, 1990.
- SMITH, D.A., y P.J. PERRY. The efficacy of ergogenic agents in athletic competition. Part I: Androgenic-anabolic steroids. *Ann. Pharmacother.* 26:520-528, 1992.
- STHOEGER Z.M., CHIORAZZI N. y LAHITA R.G.: Regulation of the immune response by sex hormones I: In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. *J. Immunol.* 141:91-98, 1988.
- THARP G. D., y PREUSS T. L.: Mitogenic response of T-lymphocytes to exercise training and stress. *J. Appl. Physiol.* 70:2535-2538, 1991.
- TSIKA, R. W., R. E. HERRICK, y K. M. BALDWIN. Effect of anabolic steroids on overloaded and overloaded suspended skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 63:2128-2133, 1987.
- VIDA, J. A. *Androgens and Anabolic Agents: Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, New York, 1969.
- VIRU, A. The mechanism of training effects: a hypothesis. *Int. J. Sports Med.* 5:219-227, 1984.
- WEICKER H., y WERLE E : Interaction between hormones and the immune system. *Int. J. Sports Med.* 12 (Suppl. 1):30-37, 1991.
- WILSON, J. D., y J.E. GRIFFIN. The use and misuse of androgens. *Metabolism* 29:1278-1295, 1980.
- WILSON, J.D. Androgen abuse by athletes. *Endocrine Rev.* 9:181-199, 1988.

CAMBIOS EN LA RESPUESTA INMUNE POR EL ESTRÉS ASOCIADO AL EJERCICIO FÍSICO

*Fuente, M. de la
Río, M. del
Ferrández, D.*

Dirección para correspondencia:

Dra. Mónica de la Fuente.
Depto. Biología Animal II,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid.
Tel. 91 3944989
E-mail: mondela@hotmail.com



Mónica de la Fuente del Rey: es Doctora en Ciencias Biológicas y Licenciada en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid (UCM), Especialista en Bioquímica Clínica y Diplomada en Sanidad. Es Catedrática de Fisiología Animal en la UCM donde dirige un grupo de investigación dedicado al estudio del sistema inmunitario. Ha sido y es Investigador Principal en proyectos, subvencionados por el Fis, I+D y CSD, sobre los efectos del ejercicio físico en la función inmune, y ha dirigido varias Tesis sobre dicho tema.



Monica del Río Zaldúa: doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid (1994) en la especialidad de Inmunología. Participa en diversos proyectos de investigación financiados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social y por la Comunidad Autónoma de Madrid y colabora en actividades docentes en el Departamento de Biología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas (UCM).



María 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.

Resumen: El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto del ejercicio físico y el estrés que éste puede conllevar sobre la función de las dos principales células inmunocompetentes: linfocitos y fagocitos. La experimentación se realizó en ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c, y el modelo de ejercicio utilizado fué la carrera en tapiz rodante. En este modelo, se analiza la función de las células inmunes tras la realización de una serie de actividades físicas puntuales de diferentes intensidades, denominadas ejercicio agudo moderado (AM) y ejercicio agudo exhaustivo (AE), y tras la realización de un programa corto y moderado de entrenamiento de una semana (EN). Igualmente se valoró, el efecto del estrés producido por el ambiente extraño que supone para el animal el tapiz rodante, para lo cual se utiliza otro grupo experimental, control tapiz (CT), en el que no se lleva a cabo ejercicio físico. Todas las valoraciones efectuadas en las diferentes pautas de actividad física indicadas, se compararon con las de los animales sedentarios, considerados como controles (C).

En cuanto a los resultados obtenidos, las distintas modalidades de ejercicio agudo puntual así como el control tapiz producen un marcado aumento en los niveles de corticosterona, indicativo de una situación de estrés en los animales. Por su parte el ejercicio

con entrenamiento de una semana, induce unos niveles de corticosterona similares a controles, manifestando una adaptación a dicha situación. Tanto el ejercicio como el estrés originan una redistribución en los linfocitos circulantes, la cual se refleja en variaciones de la concentración celular y peso de los órganos inmunocompetentes. En cuanto al efecto sobre la funcionalidad de las células inmunes, la situación de estrés que conllevan los ejercicios agudos puntuales conduce a una disminución significativa tanto del proceso fagocítico de macrófagos peritoneales como de la función linfoide a todos los niveles, mientras que el entrenamiento, produce una función linfoide y fagocítica normal, solamente en la linfoproliferación en respuesta a mitógenos se observó una disminución también en el grupo entrenado, indicando que es ésta la función inmune que resulta más afectada por el ejercicio en sí. Como conclusión final podemos decir que el ejercicio agudo produce una situación de estrés en ratones, que se refleja en una inmunosupresión de la respuesta inmune a todos los niveles. El ejercicio repetido, provoca una adaptación a la situación de estrés, con una recuperación en la mayoría de las funciones inmunes.

Palabras clave: ejercicio físico, entrenamiento, estrés, linfocito, macrófago, función fagocítica.

Abstract: The purpose of the present research project was to study the effect of physical activity and the stress it implies on the function of the two main immunocompetent cells: lymphocytes and phagocytes. The experiment was carried out with rats (*Mus musculus*) of the BALB/c strain, and the type of exercise used was running on a treadmill. In this model, the function of the immune cells was analyzed after the performance of a series of physical activity sessions of different intensities, referred to as acute moderate exercise (AM) and acute exhaustive exercise (AE), and after carrying out a short moderate exercise programme lasting one week (EN). At the same time, the effect of the stress produced in the animals by the strange environment caused by the treadmill was evaluated using another experimental group referred to as the treadmill control (CT), in which no physical exercise was performed. All the measures taken in the different treatments of physical activity mentioned were compared with those of sedentary animals, considered as controls (C).

The result obtained showed that the different modalities of sessions of acute exercise as well as the treadmill control produced a considerable increase in corticosterone levels, indicative of a situation of stress in the animals. On the other hand, the exercise involved in the week-long training programme, induced corticosterone levels similar to those of the controls, revealing an adaptation to the said situation. Both exercise and stress cause a redistribution of circulating lymphocytes, which is reflected in variations in the cellular concentration and in the weight of the immunocompetent organs. With regard to the effect on the functionality of the immune cells, the situation of stress caused by the sessions of acute exercise, lead to a significant decrease both in the phagocytic process of peritoneal macrophages and in the lymphoid function at all levels; whereas the training programme produced a normal lymphoid and phagocytic function, and only in lymphoproliferation in response to mitogens was a decrease also observed in the trained group, indicating that this is the immune function which is most affected by exercise produces a situation of stress in rats, which is reflected in immunosuppression of the immune response at all levels. Repeated exercise provokes an adaptation to the situation of stress, with a recovery in the majority of immune functions.

Key words: physical exercise, training, stress, lymphocyte, macrophage, phagocytic function.

1. INTRODUCCION.

1.1. Efecto del ejercicio físico en el sistema inmune

El hecho de que un ejercicio físico conduce a cambios funcionales del organismo ha sido conocido desde antiguo. Sin embargo el abordaje científico de tales modificaciones ha sido más reciente. En las últimas décadas se ha relacionado el ejercicio físico con la funcionalidad del sistema inmune (S.I.), sistema de reconocimiento de lo propio y defensa frente a lo extraño o alterado.

Estudios realizados tanto en humanos como en animales de experimentación parecen indicar que la influencia del ejercicio físico sobre el Sistema Inmune está condicionada *por la duración e intensidad del ejercicio, así como por el estado fisiológico de quien lo realiza*. Hay toda una serie de autores, que defienden la idea de que el ejercicio moderado regular incrementa la resistencia a infecciones (1,2), mientras que un ejercicio intenso o el sobreentrenamiento que soportan muchos deportistas, parece estar asociado con una mayor susceptibilidad a infecciones (3,4,5).

La mayoría de los estudios existentes sobre el efecto de la actividad física en el S. I. se centran en los cambios cuantitativos que experimentan las células inmunocompetentes. Las modificaciones que provoca el ejercicio físico sobre la funcionalidad de las células inmunes, han sido menos estudiados y los escasos estudios realizados se centran, principalmente, en la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta a antígenos o mitógenos.

En relación a los cambios cunitativos, si bien dependiendo del tipo, intensidad y duración del ejercicio y del estado de entrenamiento de los individuos se han descrito tanto aumentos como descensos o ausencia de cambios en el número de células de las diferentes subpoblaciones inmunes, son muchos los autores que coinciden en señalar que tras la realización de un ejercicio físico, el número de leucocitos aumenta (6,7,8,9,10).

Los estudios sobre el efecto del ejercicio físico en la funcionalidad de las células inmunes son más escasos y puntuales. Un aspecto de la respuesta inmune poco estudiado en general y en particular en lo relacionado con el ejercicio es la funcionalidad de las células fagocíticas que conforman la primera línea de defensa del sistema inmune. Dichas células (PMNs neutrófilos y monocitos en sangre circulante y macrófagos en diferentes localizaciones tisulares) desarrollan como función más representativa el proceso fagocítico. En el mismo, se suceden secuencialmente las siguientes etapas: adherencia al endotelio vascular o a sustratos tisulares, capacidad de movimiento espontáneo o dirigido por un gradiente químico (quimiotaxis), fagocitosis de las partículas extrañas y destrucción del material fagocitado.

En cuanto a la influencia de la actividad física sobre la capacidad de adherencia de las células fagocíticas al endotelio vascular, la mayoría de los autores coinciden en el hecho de que esta capacidad no varía con el ejercicio independientemente del tipo de actividad física que se efectue. Ortega y cols. (11), no encuentran cambios en la capacidad de adherencia de neutrófilos de individuos sedentarios tras someterles a ejercicio moderado. Igualmente ocurre tras ejercicio agudo hasta el agotamiento, en el que tampoco se encuentran incrementos en la capacidad de adherencia de neutrófilos (12). En ratones adultos-viejos sometidos a ejercicio agudo hasta el agotamiento, no se detectan variaciones en la capacidad de adherencia a sustrato de los macrófagos peritoneales, aunque

en estos mismos animales, aparece un aumento en la capacidad de adherencia a fibra de nylon, que reproduce "in vitro" la que acontece en el endotelio vascular (13). También en macrófagos de cobaya se observa un incremento en la adherencia tras ejercicio (natación) hasta el agotamiento (14).

En cuanto a la capacidad de movimiento de las células fagocíticas bien espontánea o la dirigida hacia el foco de infección, a favor de un gradiente químico (quimiotaxis), hay que diferenciar entre individuos entrenados o sedentarios. En individuos entrenados, que practican ejercicio de manera habitual, ambas capacidades se encuentran incrementadas (15). Sin embargo, no varían tras realizar un ejercicio agudo extenuante (7). Por otro lado, neutrófilos de hombres sedentarios sometidos a ejercicio moderado, experimentan un aumento en movilidad espontánea y quimiotaxis (11). Esto sugiere la idea de que los fagocitos están más preparados frente a invasiones tras un ejercicio moderado. En animales de experimentación, esta capacidad de movilidad y quimiotaxis no es modificada con el ejercicio agudo extenuante, pero sí aumenta significativamente en ratones con el entrenamiento físico (13,16).

La siguiente etapa del proceso fagocítico es la unión de la célula fagocítica al agente extraño. Esta unión suele favorecerse cuando el agente infeccioso se encuentra opsonizado con factores séricos (inmunoglobulinas y complemento), implicándose en dicho proceso los receptores Fc de las Ig G y los receptores para la fracción C3 b del complemento (17). Numerosos autores, han encontrado un aumento en el número de dichos receptores (C3 b y Fc) tras el ejercicio físico (18,11,15). El ejercicio por sí mismo, independientemente de otros parámetros, parece que puede estimular dichos receptores (11). Esta capacidad de unión también se ha visto aumentada en macrófagos peritoneales de ratones, tanto en los sometidos a ejercicio extenuante, como en los que realizaron un previo entrenamiento (13,16). Respecto a la influencia de la actividad física sobre la capacidad de ingestión de las células fagocíticas, los resultados son más diversos y hay que tener en cuenta al valorar esta capacidad, si el material a fagocitar son células vivas o partículas inertes. Algunos autores no encuentran variación en la fagocitosis de neutrófilos en individuos sedentarios tras realizar ejercicio agudo (7). Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en un aumento de la capacidad de ingestión de células y partículas inertes con el ejercicio, ya que este parece estimular propiedades físico-químicas de membrana que permiten dicha ingestión (13). Así, se ha encontrado un incremento en esta capacidad en neutrófilos de deportistas de élite (15), en macrófagos de humanos que realizan ejercicio agudo hasta el agotamiento (19), y en neutrófilos de individuos sedentarios sometidos a ejercicio moderado (15). También se ha detectado una estimulación de la capacidad de ingestión tras ejercicio moderado, realizado por individuos entrenados (20). No obstante, Novikov y Arzumanow (21) observaron que la actividad fagocítica va disminuyendo progresivamente dependiendo del aumento en la intensidad y duración del ejercicio. De la Fuente y cols (13,16) también han encontrado un aumento de la capacidad de ingestión en macrófagos peritoneales de ratones, tanto con ejercicio agudo, como con entrenamiento. El mismo fenómeno se ha observado también con cobayas jóvenes y viejas (22,14).

El ejercicio produce un estrés metabólico en las células fagocíticas, el cual conlleva cambios bioquímicos y un aumento de la tasa de radicales libres de oxígeno. Así Smith y cols en 1990 (4) observaron que después de una hora de ejercicio al 60 % de la capacidad aeróbica máxima de los individuos, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 , HOCl) en los neutrófilos, y esta producción es menor en entrenados respecto a los no entre-

nados, incluso antes de realizar el ejercicio. Estos autores concluyen que el ejercicio, independientemente del *status* antioxidante de los individuos, induce aumento de actividad de oxigenación en neutrófilos, posiblemente debido a la secreción de citoquinas a la circulación, o por la liberación selectiva, desde pools vasculares aislados, de subpoblaciones de neutrófilos con alta actividad de oxigenación. En macrófagos peritoneales de ratones sometidos a ejercicio extenuante se encuentra una mayor producción de anión superóxido (mediado como reducción del nitroazul de tetrazolio, NBT) en ausencia de estímulo fagocítico, tanto en ratones entrenados, como en los no entrenados (16). Estos resultados están apoyados por Ortega y cols (11), que encuentran también una mayor producción de anión superóxido en macrófagos de individuos sometidos a ejercicio moderado.

Por otro lado, en cuanto a las células linfoides, mientras que su número de linfocitos en sangre puede resultar elevado por la actividad física, son muchas las investigaciones que sugieren que la función de estas células se encuentra disminuida (23,24,25).

La mayoría de los estudios encuentran una disminución en la respuesta proliferativa a mitógenos de linfocitos, tanto B como T, en individuos no entrenados tras ejercicio y en individuos entrenados (26,27). Hedfors (28) relacionó la disminución de linfocitos T en respuesta a mitógenos, con la disminución en la proporción de linfocitos CD4 que ocurre tras la actividad física. Según Keast y cols. (23) la reducida respuesta a mitógenos en células T y B, y la menor proporción en CD4, refleja una temporal inmuno-supresión en la inmunidad mediada por células, y esto se traduce en un mayor riesgo de infecciones en los atletas.

En animales, se han realizado estudios similares con linfocitos de bazo, timo y ganglios axilares, y se ha observado que el ejercicio exhaustivo produce una marcada disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos al mitógeno PHA, mientras que el ejercicio continuo origina un proceso de adaptación que se refleja en una moderada o intensa linfoproliferación en ratones jóvenes y adultos (29).

1.2. Estrés y sistema inmune

Fué a principios de este siglo, cuando Cannon aborda por primera vez el concepto de estrés, al cual define como: "todo agente capaz de inducir una respuesta o tensión en el mecanismo homeostático del cuerpo". Posteriormente, Selye (30) define el estrés como una respuesta no específica del organismo ante las agresiones externas. Estas respuestas inespecíficas son inducidas por agentes estresantes (inmovilización, ruido, temperaturas extremas, ejercicio físico, etc.) y son independientes de la naturaleza del estímulo que las provoca.

Todo este conjunto de respuestas no específicas fueron descritas bajo la denominación de *Síndrome General de Adaptación (SGA)*, (31). El SGA describe una reacción inmediata del organismo (reacción de alarma) frente al estímulo nocivo y tiene una serie de manifestaciones, como son: aumento de la frecuencia cardíaca y tono vasomotor, mayor aporte sanguíneo a cerebro y músculo en detrimento de piel y vísceras, aumento del número de linfocitos y eritrocitos circulantes, mayor eficacia de los mecanismos de coagulación, dilatación bronquial e incremento de la capacidad respiratoria, etc. Esta reacción de alarma, es debida a una estimulación simpática generalizada y es mantenida, a corto plazo, por la liberación de catecolaminas meduloadrenales.

Cuando la exposición al estímulo estresante se mantiene, tiene lugar la fase de resistencia o adaptación, en la que Selye (30) destaca la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), que conduce al incremento en la secreción de glucocorticoides por la corteza adrenal (32). El aumento de la actividad glucocorticoide provoca una gluconeogénesis hepática, disminuyen las reacciones inflamatorias e inmunológicas, y se reduce la producción de otras hormonas hipofisarias en favor de la ACTH (32,33).

Numerosas investigaciones han abordado la relación entre el agente estresante y la respuesta que este desencadena (34). En general, es correcto admitir que no existe una respuesta general del estrés, sino respuestas de estrés específico, a estímulos específicos. Así, por ejemplo, situaciones como el miedo, dolor, ansiedad, y las que implican actividad mental aumentan principalmente los niveles de adrenalina, mientras que la conducta agresiva ó las situaciones relacionadas con el ejercicio físico, incrementan principalmente los niveles de noradrenalina (35). Por otro lado, todas las reacciones de estrés implican la integración de factores fisiológicos y psicológicos. Así además de la intensidad, naturaleza y duración del agente estresante, hay que tener en cuenta una serie de factores que condicionan la respuesta del individuo al estrés; entre estos factores se encuentra el estado emocional del individuo, la predictibilidad y la capacidad de escapar a la acción del agente estresante (36)

1.2.1. Aspectos Neuroinmunoendocrinos del estrés.

El sistema neuroendocrino, fundamental sistema regulador animal, se encuentra estrechamente relacionado con el S. I., contribuyendo conjuntamente al mantenimiento de la homeostasis animal. La relación entre ambos fué descrita por primera vez por Besedovsky y cols. (37) y confirmada posteriormente con numerosos estudios (38,39,40,41).

Una consecuencia directa de la interacción entre los sistemas Neuroendocrino e Inmune, es la aumentada sensibilidad de la respuesta inmune al estrés (42). Como ya se ha comentado, la respuesta del organismo frente a las situaciones de estrés está mediada por alteraciones neuroendocrinas, dichas alteraciones tienen efectos importantes en determinados aspectos de la función inmune. Así, ante una situación de estrés, se produce una activación permanente del eje HHA, que provoca el desajuste en los mecanismos de modulación de la secreción de la adenohipófisis, ésta produce ACTH, hormona que controla la síntesis de glucocorticoides en la corteza adrenal, alterando a su vez, la producción de otras hormonas tróficas.

En relación al efecto de la respuesta inmune sobre la función neuronal se sabe que la estimulación antigénica de los leucocitos produce señales que no sólo llegan a los demás componentes del S.I. sino también al cerebro y a los órganos neuroendocrinos (43). Estas señales incluyen citoquinas y hormonas producidas y liberadas por el S.I. Teniendo esto en cuenta, la influencia del estrés en la inmunidad no es un fenómeno aislado, sino un mecanismo de comunicación entre sistemas fisiológicos.

1.2.2. Modelos experimentales de estrés: El ejercicio físico

Las numerosas investigaciones experimentales sobre el estrés tienen una característica en común: la exposición del animal a un ambiente nuevo, extraño y en nada familiar. No obstante se ha venido clasificando el estrés en estrés psíquico (competencia, tensión, miedo, situaciones que implican peligro, etc) y estrés físico (ejercicio, descargas eléctricas, inmovilización, temperaturas extremas, etc).

Hay que tener en cuenta, al estudiar una situación de estrés, no solo el agente estresante, sino múltiples factores que influyen sobre las reacciones fisiológicas del individuo como son: preparación, sexo, estado emocional, etc. Existen múltiples eventos estresantes en la vida cotidiana tales como los periodos de presión académica en estudiantes, los exámenes, separaciones matrimoniales, periodos de desempleo, etc. Incluso la amenaza de recibir un estímulo nocivo puede suponer una situación estresante. Así, en pacientes que van a ser sometidos a intervenciones quirúrgicas, la situación de expectación del acto constituye un estímulo estresante y determina un aumento en la secreción de cortisol (44).

Existen múltiples estímulos estresantes que se utilizan en la experimentación animal, entre ellos el choque eléctrico bajo diversos planes de descarga (43), los estímulos sociales conoespecíficos (debidos a un aumento en la densidad de la población o a lo contrario) (45), agentes estresantes como luz, sonido, temperaturas extremas, incluso anestésicos como el éter (46). También el ejercicio muscular representa un modelo específico de estrés (47). Existen numerosos datos en la bibliografía que muestran que el ejercicio físico, en diversas modalidades: natación (47), carrera en tapiz rodante (48) o bicicleta (49), provoca cambios en neurotransmisores (catecolaminas) y hormonas (cortisol y péptidos opioides), conocidos moduladores de la función inmune (50).

1.2.3. Efectos del estrés en el sistema inmune.

Es ampliamente conocido que el estrés, tanto psicológico como físico, altera la función del S.I. (42). Así, en el ser humano, diferentes investigaciones han encontrado relación significativa entre el estrés y algunas variables del sistema inmunitario (51,52). El estrés no es siempre inmunosupresor, las influencias del agente estresante en la respuesta inmune son complejas y dependen no solo de las características de dicho agente estresante (duración, intensidad, naturaleza), sino también del tiempo en el cual se aplica tal agente en relación al curso de la respuesta inmune. Algunas formas de estrés pueden incrementar las defensas frente a organismos patógenos (43) y aumentar distintas respuestas inmunes (53,54).

Como ya se ha comentado anteriormente, con el estrés se produce una estimulación del eje H-H-A con el consiguiente aumento de la secreción adrenocortical y de glucocorticoides, así como una activación del SN simpático, seguido por una liberación de las catecolaminas (44). De esta forma, las hormonas adrenocorticales y el sistema simpatoadrenal han sido propuestos como mediadores de los efectos inmunosupresores del estrés (55).

El S. I. responde al estrés de diversas maneras constituyéndose en una respuesta homeostática, que puede significar una protección contra la enfermedad o una facilitación de la misma. La naturaleza y la intensidad del estrés determina la respuesta del S. I. (56). Dos mecanismos están involucrados en la inmunosupresión debida al estrés; el primero concierne a los cambios que el estrés produce en las poblaciones celulares inmunocompetentes y el segundo a los cambios en la actividad y función de las células inmunocompetentes (47).

Por todo lo anteriormente expuesto y dado que los trabajos existentes en relación a los cambios inmunes por efecto de la actividad física, y/o el estrés que puede estar asociado a la misma, se centran principalmente en cambios cuantitativos de las células inmunocompetentes, habiendo sido apenas estudiada la funcionalidad de estas células, y puesto que además pocas investigaciones delimitan los efectos funcionales del ejercicio físico *per se* de los debidos a la situación de estrés que puede presentarse en el desarrollo del mismo, se ha planteado, como objetivo general del presente trabajo, estudiar

el efecto del ejercicio físico y el estrés que éste puede conllevar sobre la función de las dos principales células inmunocompetentes: linfocitos y fagocitos.

La experimentación se realizó en ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c, y el modelo de ejercicio utilizado fué la carrera en tapiz rodante. En este modelo, se analiza la función de las células inmunes tras la realización de una serie de actividades físicas puntuales de diferentes intensidades, denominadas ejercicio agudo moderado (AM) y ejercicio agudo exhaustivo (AE) y tras la realización de un programa corto y moderado de entrenamiento de una semana (EN). Igualmente se valoró, el efecto del estrés producido por el ambiente extraño que supone para el animal el tapiz rodante, así como la descarga eléctrica que recibe en la carrera. Para ello se analiza el efecto de una sesión sin ejercicio pero utilizando el tapiz rodante: grupo control tapiz (CT), en la función de las células inmunocompetentes. En este grupo los efectos observados son debidos mayoritariamente al estrés y no al ejercicio en sí.

Todas las valoraciones efectuadas en las diferentes pautas de actividad física indicadas: agudo moderado (AM), agudo exhaustivo (AE), entrenamiento (EN) y control tapiz (CT), se compararon con las de los animales sedentarios, considerados como controles (C).

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1. Material biológico

La experimentación se ha realizado con ratones *Mus musculus* de la cepa BALB/c procedentes de Iffa Credo y mantenidos en el animalario de nuestro departamento en condiciones estándar de alimentación: con pienso PANLAB y agua *ad libitum*. El animalario se encontraba a una temperatura de 22^o C y con fotoperiodo invertido de 12 h. luz y 12 h. oscuridad. Los animales utilizados fueron machos adultos con una edad de 24±4 semanas.

2.2. Programa de entrenamiento físico.

Los animales fueron sometidos a ejercicio en un tapiz rodante SCIENTIFIC INSTRUMENTS modelo L18706.

Se distribuyeron en 5 grupos (6 ratones por bloque) :

- 1 - Controles sedentarios (C)
- 2- Ratones sometidos a un ejercicio puntual moderado (AM)
- 3- Ratones sometidos a un ejercicio puntual exhaustivo (AE)
- 4- Ratones sometidos a un ejercicio puntual relajado, como medida de control del estrés producido por el tapiz rodante (CT)
- 5- Ratones sometidos a un periodo de entrenamiento de una semana de duración (EN)

Todos los animales se sometieron a un periodo de adaptación, la semana previa al ejercicio, consistente en 2 sesiones de una hora sin velocidad y sin inclinación del tapiz, para familiarizar a los animales con el aparato. El programa de ejercicio para cada uno de los

grupos que lo efectuaron de forma puntual se detalla en la **tabla I**, y el programa de entrenamiento en la **tabla II**.

El sistema de descarga eléctrica del aparato que se emplea en todos los ejercicios puntuales se sitúa en una intensidad de 0'2 mA . En el periodo de entrenamiento, los 5 primeros días se utiliza la descarga para conseguir una rápida adaptación de los animales al tapiz, y se desconecta el último día, para evitar la posible influencia del estrés provocado por la misma.

Tabla I. Programa de ejercicios puntuales.

	Duración (min)	Velocidad (cm/sg)	Inclinación (°)
AM	60	15	10
AE	60	25	20
CT	60	8	0

Tabla II. Programa de entrenamiento.

Día	Duración (min)	Velocidad (cm/sg)	Inclinación (°)
1º	60	8	0
2º	60	8	0
3º	60	8	5
4º	60	10	5
5º	60	15	10

2.3. Obtención de las muestras biológicas

Tras la sesión de ejercicio, los animales se pesan y se sacrifican por dislocación cervical, obteniéndose seguidamente las distintas muestras biológicas.

2.3.1. Obtención de suero.

Tras la muerte del animal , se decapita y se recoge aproximadamente 1 ml de sangre del que se extrae por centrifugación el suero que se congela y se almacena a -20°C hasta su utilización.

2.3.2. Obtención de macrófagos peritoneales.

Se retira la piel del abdomen sin abrir la cavidad peritoneal y se inyectan 3 ml de medio Hank's, se efectúa un masaje del abdomen y se recupera aproximadamente el 90 % de la suspensión inyectada.

Esta suspensión contiene fundamentalmente linfocitos y macrófagos, que son contabilizadas en hemocitómetro de Neubauer y ajustados a $5 \cdot 10^5$ macrófagos / ml con medio Hank's usándose de inmediato para los distintos ensayos de función fagocítica.

2.3.3. Obtención de linfocitos de bazo, timo y ganglios axilares.

En condiciones de esterilidad, se extraen el bazo, timo y ganglios axilares. Tras pesar los órganos, éstos se maceran en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (SBF) y gentamicina. La suspensión celular de timo y ganglios se lavan con PBS estéril a 1500 rpm, durante 10 minutos y a 20°C. Los leucocitos de bazo se separan en un gradiente de Ficoll-Hipaque (densidad 1,070) y posteriormente se lavan. Las suspensiones así obtenidas se ajustan a 10^6 linfocitos / ml de medio, utilizando medio completo (RPMI+SBF+gentamicina) para cultivos celulares y medio Hank's para quimiotaxis y movilidad espontánea.

2.4. Estudio de la función fagocítica.

A continuación se describe la metodología utilizada para el estudio de las diferentes etapas del proceso fagocítico en los macrófagos peritoneales.

2.4.1. Movilidad dirigida o Quimiotaxis.

La quimiotaxis de macrófagos peritoneales se valoró según la técnica de Boyden, ligeramente modificada por nuestro grupo (57).

Se utilizan cámaras con dos compartimentos de 9 mm de diámetro interno y ambos compartimentos se separan por un filtro de 3 μ m de poro. En el compartimento inferior se introducen 400 μ l de un quimioatrayente (N-formil-met-leu-phe a una concentración 10^{-8} M) y en el superior 300 μ l de la suspensión celular ajustada a $5 \cdot 10^5$ macrófagos / ml. Las cámaras se incuban durante 3 horas a 37°C, en una atmósfera al 5 % de CO₂ y con humedad a saturación. Transcurridas ese tiempo, se extraen los filtros, que son fijados y teñidos y se realiza el recuento del número de células que han atravesado el filtro, expresando el resultado como Índice de Quimiotaxis (I.Q.)

2.4.2. Fagocitosis de partículas de latex.

Para valorar la capacidad que tienen los macrófagos de ingerir cuerpos extraños, se usó la técnica descrita por De la Fuente (58).

Se depositan 200 μ l de la suspensión peritoneal ajustada a $5 \cdot 10^5$ macrófagos / ml en pocillos de placas MIF, se incuban durante 30 minutos a 37°C y se lavan con PBS. De esta forma, se obtiene una monocapa de células adheridas a los pocillos. A continuación se añaden 200 μ l del medio Hank's y 20 μ l de látex al 0'1 % en PBS, y se incuban 30 minutos a 37°C. Tras la incubación se lavan los pocillos enérgicamente con PBS para eliminar las partículas de látex no fagocitadas, y procedemos a la fijación y tinción de las células. Se efectúa el recuento del número de partículas fagocitadas por cada 100 macrófagos, valor que representa el Índice de fagocitosis (I.F.).

2.4.3. Test de Reducción del Nitroazul de Tetrazolio.

Este test se realizó siguiendo la técnica descrita por De la Fuente (58) y modificada posteriormente (59).

Sobre alícuotas de 250 μ l de la suspensión celular ajustada a $5 \cdot 10^5$ macrófagos / ml se añaden 250 μ l de NBT (1 mg /ml de Hank's) y 50 μ l de partículas de látex al 0'1 % (siendo éstas las muestras estimuladas) ó 50 μ l de medio Hank's (muestras no estimuladas). Se incuba en baño de agitación suave a 37°C, durante una hora. Tras la incubación se para la reacción con Cl H 0'5 N, centrifugándose las muestras a 1600g 30 min y extrayendo con dioxano el NBT reducido. Los tubos se agitan bien y se centrifugan de nuevo 30 minutos a 1600 g midiéndose a continuación la absorbancia a 525 nm en los sobrenadantes. Los resultados se expresan como densidad óptica (D.O.)

2.5. Estudio de la función Linfoide.

La funcionalidad de los linfocitos de bazo, timo y ganglios axilares se estudia analizando su actividad más característica: la respuesta proliferativa a mitógenos, usando como mitógeno la Concanavalina A (Con A), para lo cual se utilizará el "Test de Transformación Linfoblástica" (TTL). Este test reproduce las pautas fisiológicas de respuesta a antígenos que estas células desarrollan *in vivo* en el organismo.

Igualmente, se analiza la capacidad de movilidad dirigida (quimiotaxis) de linfocitos, siendo ésta una función necesaria y previa al reconocimiento antigénico. La metodología empleada fué la descrita en el apartado correspondiente del proceso fagocítico.

2.5.1. Respuesta Proliferativa de linfocitos.

Para valorar la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo, timo y ganglios axilares, estas células fueron sembrados en placas de cultivo (NUNCLON) de 96 pocillos, en alícuotas de 200 μ l de la suspensión celular ajustada a 10^6 linfocitos / ml por pocillo. Tras añadir 20 μ l de mitógeno (Con A) a una concentración de 30 μ g/ml, las placas se incuban durante 48 horas, a 37°C, 5 % de CO₂ y atmósfera saturada de humedad. Transcurrido este tiempo, se eliminan 100 μ l de la suspensión celular en cada pocillo y se añaden 10 μ l de MTT, colorante que incluyen y reducen las células vivas. Se incuban las placas de nuevo durante 4 horas y se añaden 100 μ l de solución de solubilización a cada pocillo, para parar la reacción. Esta solución produce lisis celular, liberándose el MTT reducido, que se contabiliza en un contador E.L.I.S.A. a 570 nm. Los resultados se expresan como D.O.

2.6. Determinación de corticosterona en sueros.

Se miden los niveles de corticosterona en sueros para comprobar el estado de estrés de los animales sometidos a ejercicio. Se ha utilizado una técnica de radioinmunoensayo (INC Biomedicals). Los resultados se expresan como nanogramos de corticosterona por mililitro de suero (ng / ml).

2.7. Estudio estadístico

Los resultados se expresan mediante la media aritmética y desviación estándar de los datos obtenidos en las diferentes pruebas. La comparación de las medias normales entre dos grupos experimentales se efectuó por el test de la U de Mann- Whitney, para valores no paramétricos. Se consideró no significativa una $p > 0,05$. Cuando las diferencias tienen una $p < 0,05$ se consideran como significativas y con $p < 0,01$ como muy significativas.

3. RESULTADOS.

3.1. Peso corporal y peso relativo de órganos

En primer lugar se muestran los resultados de los pesos corporales de los animales y del peso relativo de los órganos inmunocompetentes: bazo, ganglio y timo en los cinco grupos experimentales: ejercicio agudo moderado (AM), ejercicio agudo exhaustivo (AE), entrenamiento moderado (EN), así como el control tapiz (CT), en comparación con los controles sedentarios (C).

En cuanto al peso corporal, no se encontraron diferencias con el ejercicio, siendo el valor del control de $41,0 \pm 1,3$ g.

Los resultados de los pesos relativos, expresados en mg órgano/ g peso corporal, para los bazos, ganglios y timos, pertenecientes a los 5 grupos experimentales, se exponen de forma resumida en la Tabla 1.

TABLA 1: Peso relativo de órganos inmunocompetentes (mg/g).

	BAZO	GANGLIOS	TIMO
C	$5,9 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$
CT	$6,2 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1^{ac}$
AM	$4,5 \pm 0,4^{ad}$	$1,5 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1^{ac}$
AE	$5,1 \pm 0,5^c$	$1,8 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$
EN	$6,1 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$

Cada valor representa la media \pm DE de 6 experimentos. Nivel de significación: a: $p < 0,05$, respecto a C; c: $p < 0,05$; d: $p < 0,01$, respecto a EN.

Como puede apreciarse, respecto a controles (C) existe una disminución significativa en el peso del bazo ($p < 0,05$) de ratones sometidos a ejercicio moderado, y en timo en animales sometidos a agudo moderado y control tapiz ($p < 0,05$). En ganglio no se encuentran variaciones significativas en su peso con ningún tipo de ejercicio. En relación a los pesos en entrenados aparece un aumento significativo en bazo de los animales que efectúan ejercicio agudo tanto moderado como exhaustivo, así como en el timo de los agudo moderado y control tapiz.

3.2. Cuantificación de macrófagos y linfocitos

La concentración de macrófagos y de linfocitos peritoneales (n° células $\times 10^4$ / ml de suspensión) se muestra en la fig. 1. Podemos observar que, en relación a controles sedentarios, los ejercicios estudiados, con excepción del agudo exhaustivo, producen una disminución en el número de macrófagos. En los resultados correspondientes al número de linfocitos peritoneales, aparece un aumento significativo ($p < 0,01$) en ejercicios agudos puntuales (AM y AE) respecto a C y EN.

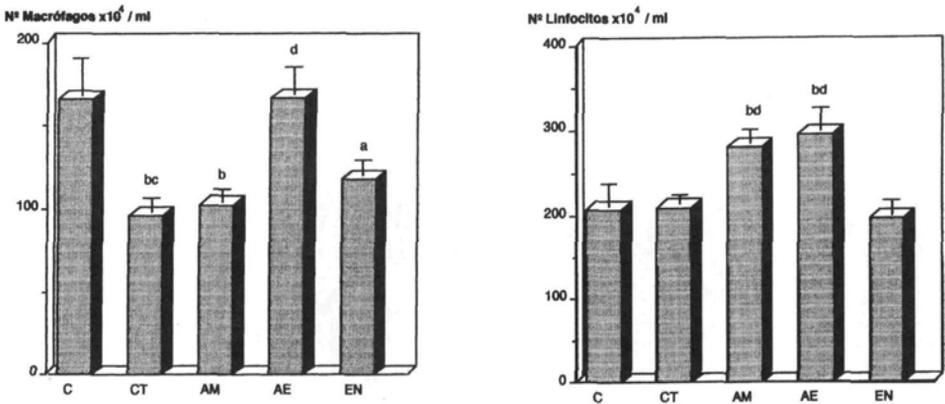


Figura 1. Número de macrófagos y linfocitos peritoneales por ml de suspensión. Cada valor representa la media \pm D.E. de 6 experimentos. Nivel de significación: a: p<0,05; b: p<0,01 respecto a C ; c: p<0,05 ; d: p<0,01 respecto a EN.

En relación al efecto del ejercicio en el número de linfocitos de los órganos inmunocompetentes (fig. 2), en bazo, se observa un aumento en el número de linfocitos en el caso de AM y CT respecto al control (p<0,01) . La concentración de linfocitos de ganglios muestra un aumento altamente significativo (p<0,01) en control tapiz, y una disminución en ejercicio moderado (AM) (p<0,01) respecto a controles. En la concentración de linfocitos de timo se observa una disminución significativa (p<0,01) en CT, AE y EN respecto a controles.

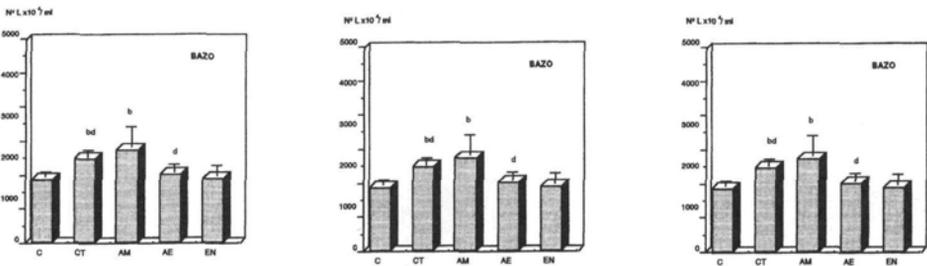


Figura 2. Número de linfocitos de bazo, ganglios y timo por ml de suspensión. Cada valor representa la media \pm D.E. de 6 experimentos . Nivel de significación: b: p<0,01 respecto a C ; c: p<0,05 ; d: p<0,01 respecto a EN.

3.3. Niveles séricos de corticosterona

En la fig.3 se representan los niveles séricos de corticosterona (ng/ml), indicativos del grado de estrés provocado por los diferentes ejercicios. Todos los grupos sometidos a ejercicio puntual (AM y AE) así como el control tapiz (CT) presentan diferencias significativas respecto al grupo control (C) y al entrenado (EN).

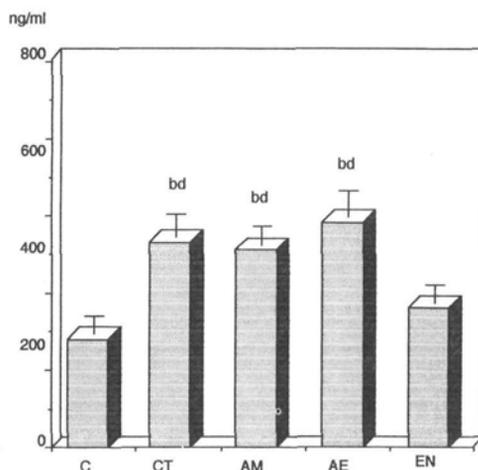


Figura 3. Niveles séricos (ng/ml) de corticosterona. Cada valor es la media \pm D.E. de 6 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación: **b**: $p < 0,01$ respecto a C; **d**: $p < 0,01$ respecto a EN.

3.4. Función fagocítica de macrófagos peritoneales

A continuación se indican los resultados correspondientes al efecto de las citadas pautas de ejercicio sobre el proceso fagocítico de macrófagos peritoneales, estudiado en las etapas más representativas del mismo: quimiotaxis, ingestión de partículas inertes y producción del anión superóxido (medido como reducción del NBT).

3.4.1. Quimiotaxis

Los resultados obtenidos, expresados como índice de quimiotaxis (I.Q.) se muestran en la fig.4. La actividad física puntual induce en dicha capacidad una disminución progresiva según la intensidad del ejercicio, disminución que se hace por tanto, más patente en el grupo AE.

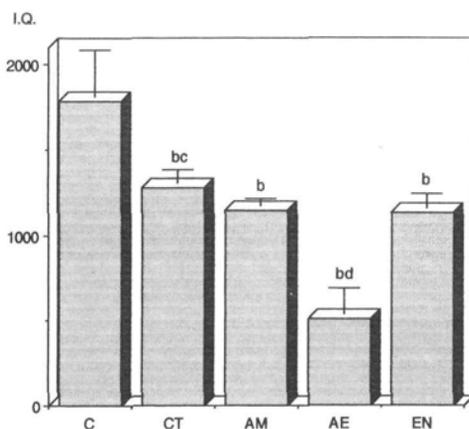


Figura 4. Índices de quimiotaxis (IQ) de macrófagos peritoneales. Cada valor: media \pm D.E. de 6 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación: **b**: $p < 0,01$ respecto a C ; **c**: $p < 0,05$; **d**: $p < 0,01$ respecto a EN.

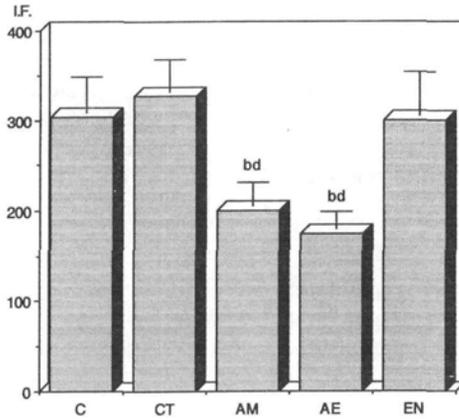


Figura 5. Índice fagocítico (IF) de macrófagos peritoneales. Cada valor media \pm D.E. de 6 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación: **b**: $p < 0,01$ respecto a C; **d**: $p < 0,01$ respecto a EN.

El entrenamiento provoca una disminución significativa en la capacidad quimiotáctica de macrófagos peritoneales respecto al grupo C ($p < 0,01$), y con valores similares a los ejercicios puntuales CT y AM que por su parte muestran valores muy próximos.

3.4.2. Fagocitosis

En la fig. 5 se muestran los resultados correspondientes a la capacidad de ingestión de macrófagos peritoneales. Se expresan como Índice de Fagocitosis (I.F.), que representa el número de bolas de latex ingeridas por 100 macrófagos. El ejercicio físico puntual (AM y AE) produce una disminución significativa ($p < 0,01$) respecto a C. Ni el grupo CT, ni el de entrenamiento inducen modificaciones respecto al control.

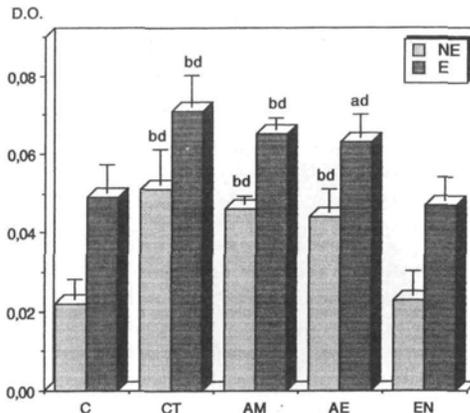


Figura 6. Reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) en macrófagos peritoneales de muestras estimuladas, E, y no estimuladas, NE. Cada valor representa la media \pm D.E. de 6 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación : **a**: $p < 0,05$; **b**: $p < 0,01$ respecto a C ; **d**: $p < 0,01$ respecto a EN.

3.4.3. Reducción del NBT

En la fig. 6 se indican las absorbancias, leídas a 525 nm, de la reducción del NBT en los 5 grupos experimentales. Se presentan los valores obtenidos tanto en las muestras estimuladas con látex (E), como en las no estimuladas (NE). Los ejercicios puntuales AM y AE, así como el CT, producen un aumento estadísticamente significativo en la reducción del NBT, esto ocurre en muestras estimuladas y no estimuladas. El grupo sometido a entrenamiento muestra unos valores de reducción del NBT similares a los del grupo C.

3.5. Función linfoide

A continuación se exponen los resultados obtenidos en relación a la función linfoide. Se han utilizado linfocitos de bazo, ganglio, timo y peritoneo para valorar la quimiotaxis, capacidad que comparten con macrófagos, y los procedentes de los órganos inmunocompetentes para la proliferación (espontánea o en respuesta al mitógeno Con A).

3.5.1. Quimiotaxis.

Los resultados obtenidos en relación a la variación del Índice quimiotáctico (I.Q.) de linfocitos de la suspensión peritoneal con el ejercicio se muestran en la fig. 7. Podemos observar como los grupos CT y EN presentan una estimulación significativa en el I.Q., con valores superiores en CT. Con ejercicios agudos obtenemos una disminución en dicha capacidad.

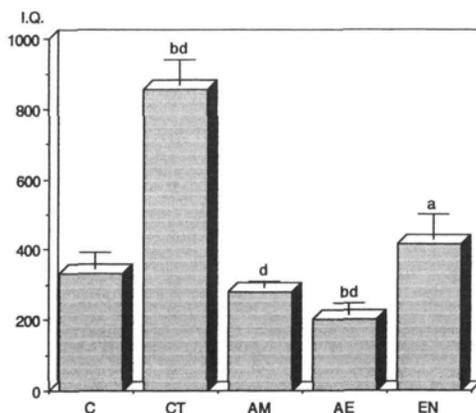


Figura 7. Índices de quimiotaxis (IQ) de linfocitos peritoneales. Cada valor representa la media \pm D.E. de 6 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación: a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$ respecto a C; d: $p < 0,01$ respecto a EN.

En la fig. 8 se presentan las variaciones en la capacidad de quimiotaxis de linfocitos de bazo, ganglios y timo, y como puede observarse, en el bazo, se produce una disminución con todos los ejercicios puntuales, que progresa con la intensidad del ejercicio y en el grupo CT, mientras que el grupo de entrenamiento (EN) muestra valores similares al control. En los resultados obtenidos en ganglio, todos los grupos mostraron una disminución significativa respecto a controles mucho más marcada en los grupos CT, AM y AE que en el entrenado (EN). En cuanto a los linfocitos de timo, se repite, el patrón ya comentado en bazo.

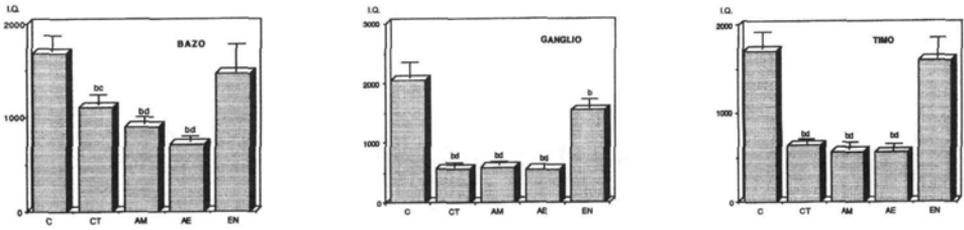


Figura 8. Índices de quimiotaxis (IQ) de linfocitos de bazo, ganglio y timo. Cada valor representa la media \pm D.E. de 6 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación: **b**: $p < 0,01$ respecto a C; **c**: $p < 0,05$; **d**: $p < 0,01$ respecto a EN.

3.5.2. Capacidad de proliferación de linfocitos de órganos inmunocompetentes

A continuación, se exponen los resultados correspondientes a la capacidad linfoproliferativa (espontánea y en respuesta al mitógeno Con A) de los órganos inmunocompetentes. Los datos son expresados en densidad óptica (D.O.), como se indicó en el apartado correspondiente de Métodos.

3.5.2.a. Proliferación Espontánea.

Los resultados de proliferación espontánea se presentan en la fig.9. En bazo, se observa una disminución significativa ($p < 0,01$) en ratones que realizaron ejercicio exhaustivo, respecto a todos los demás grupos. Los resultados en ganglio muestran una inhibición con los ejercicios agudos (AM y AE) respecto al resto de grupos (C, CT y EN). En timo, se aprecia una disminución en dicha capacidad con los ejercicios puntuales, mayores cuanto mayor es la intensidad del ejercicio (así, se obtienen los valores más bajos en el grupo AE) y en el grupo CT.

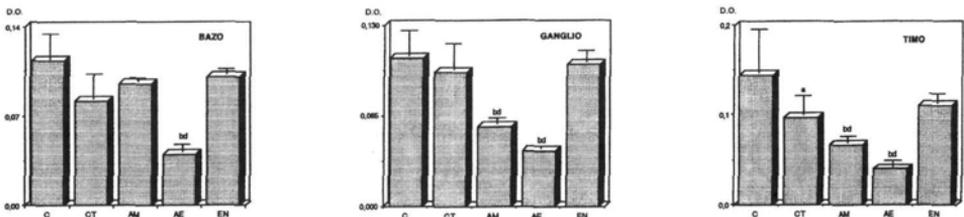


Figura 9. Linfoproliferación espontánea de bazo, ganglio y timo expresada en valores de densidad óptica (DO). Cada valor representa la media \pm D.E. de 6 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación: **a**: $p < 0,05$; **b**: $p < 0,01$ respecto a C; **d**: $p < 0,01$ respecto a EN.

3.5.2.b. Linfoproliferación en respuesta a mitógeno (Con A).

Los resultados de proliferación en respuesta a mitógeno (Con A 3 μ g/ml), se muestran en la fig.10. En el bazo y en el ganglio, esta capacidad resulta inhibida en todos los grupos, incluso en el de entrenamiento. En el timo se observó una inhibición con los ejercicios agudos y en el grupo entrenado, mientras que el grupo CT no mostró modificaciones significativas respecto al C.

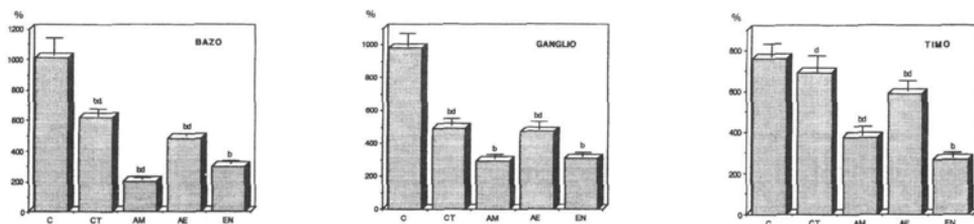


Figura 10. Porcentaje de linfoproliferación en bazo, ganglio y timo en respuesta al mitógeno Con A. (3µg/ml). El porcentaje se calculó dando el valor 100% a la DO obtenida en los linfocitos incubados en ausencia de mitógeno. Cada valor representa la media \pm D.E. de 6 experimentos realizados por duplicado. Nivel de significación: b:p<0,01 respecto a C; d:p<0,01 respecto a EN.

4. DISCUSIÓN

Los datos que se recogen en la literatura sobre el efecto del ejercicio y del estrés asociado al mismo en el sistema inmune, son escasos y contradictorios, y se centran fundamentalmente en variaciones cuantitativas de las células inmunes, habiendo sido muy poco estudiados los correspondientes a su funcionalidad.

En el presente trabajo, fueron elegidas, como células inmunes sobre las que realizar el estudio, los linfocitos, células principales del sistema inmune (60) y los fagocitos, células accesorias imprescindibles en la respuesta inmunológica inespecífica pero también en la específica que realizan los linfocitos (61).

El ejercicio físico constituye un modelo de estrés, clásicamente establecido (62), capaz de promover toda una serie de modificaciones en los diferentes sistemas de regulación, en los que hay que incluir no solamente el sistema nervioso y el endocrino, sino también al sistema inmune, y en las relaciones que tienen lugar entre dichos sistemas para mantener conjuntamente la homeostasis del organismo (40,41). En el presente trabajo se ha intentado diferenciar el efecto que el ejercicio *per se* y el estrés asociado al mismo tienen en la función inmune. Para ello se eligió la carrera en tapiz rodante, presuponiéndola como un tipo de actividad física estresante. Las pautas de ejercicio elegidas fueron una serie de actividades físicas puntuales de distintas intensidades: agudo moderado (AM), agudo exhaustivo (AE) y control tapiz (CT), así como un programa de entrenamiento corto (EN), valorando en todos ellos las variaciones séricas de corticosterona como medida del estrés asociado a cada una de tales actividades.

4.1. Efecto de la actividad física en los niveles de corticosterona

Diversos factores, incluido el ejercicio físico, conducen a una serie de respuestas en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (H-H-A), induciendo una cascada de efectos hormonales coordinados, que influyen en el comportamiento de las células inmunes (63,39). Es conocido que tras ejercicio físico estresante se produce estimulación del eje H-H-A, con la consiguiente secreción de ACTH, y la posterior liberación de glucocorticoides (64).

En general, es comúnmente asumido que la elevación en esteroides adrenocorticales, es la mayor manifestación del efecto del estrés, y es responsable de la supresión observada en la reactividad inmunológica asociada al estrés (64).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y que la carrera en tapiz rodante puede ser un modelo de estrés (48), se midieron los niveles de corticosterona en los diferentes grupos experimentales para valorar el estrés asociado a las actividades físicas a las que fueron sometidos los animales. En este sentido, los resultados indican que las modalidades de ejercicio agudo producen un aumento significativo en los niveles de corticosterona, mayor cuando el ejercicio es exhaustivo que cuando es moderado, esto es, dicha concentración aumenta con la intensidad del ejercicio. Algunos autores (65) han descrito este incremento hormonal como característico de este tipo de actividad. En el grupo CT se encuentran aumentos significativos en la concentración de corticosterona, con valores muy similares a los obtenidos en los ejercicios agudos AM y AE. Como se comentó anteriormente, éste grupo se utilizó como medida del estrés que produce en los animales la exposición a un ambiente extraño: el tapiz rodante, puesto que, las condiciones en este grupo (sin inclinación, y 8 cm/sg. de velocidad) no pueden ser consideradas ejercicio.

En base a estos resultados se puede considerar, que los efectos encontrados en estas actividades agudas puntuales (AM y AE) sobre el Sistema Inmune, no son debidas al ejercicio como tal, sino al estrés asociado al mismo. Esto concide con diversos autores (66,67) que han indicado como el efecto del ejercicio en el sistema inmune, es debido al estrés asociado al mismo y que las diferencias que se encuentren, dependen del grado de estrés.

Por otro lado, el grupo sometido a un periodo de entrenamiento de una semana, previo a la realización de la actividad física, presenta unos niveles de corticosterona similares al grupo control. Estos resultados parecen indicar una adaptación a la situación de estrés. Los resultados del presente trabajo coinciden con los encontrados por varios autores en distintas especies. Así Becker y cols (68), observaron que los niveles de cortisol volvían a los valores basales tras someter a cerdos a repetidas situaciones de estrés. Porta y cols (69) encontraron similares resultados en humanos tras varios ejercicios en bicicleta ergométrica. Según éstos autores, los resultados no indican ausencia de estrés, sino adaptación al mismo. La respuesta al estrés depende mucho de la previa experiencia del individuo, una experiencia de estrés *a priori*, puede modular las siguientes situaciones de estrés, incluso las alteraciones hormonales (69). Por tanto, parece que en el grupo de entrenamiento tiene lugar una adaptación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, al repetir la situación de estrés. Según Rushen y cols. (70), los opioides endógenos pueden inhibir la actividad H-H-A, jugando una papel en esta adaptación. Como consecuencia, en este grupo sometido a entrenamiento, los efectos que se observan en la función inmune, pueden atribuirse al ejercicio, ya que se ha producido una adaptación al estrés.

4.2. Efecto de la actividad física, como modelo de estrés, en el peso y numero de células de los órganos inmunocompetentes

En relación al peso corporal, no aparecen diferencias entre los diferentes grupos experimentales. Respecto a la concentración de macrófagos peritoneales, ésta se encuentra disminuida en todos los grupos en relación a controles. Tales resultados coinciden con los encontrados anteriormente por nuestro grupo de investigación. Así se ha observado una disminución en la concentración de macrófagos peritoneales tras realización de ejercicio agudo en ratones Swiss (59) y en cobayas (22). Dicha disminución puede ser consecuencia de una aumento en la capacidad de adherencia, que a su vez puede

verse inducida por el aumento en los niveles de corticosterona que se produce como consecuencia del estrés que induce la actividad física (22). Por su parte según Carvajal y cols., (44), la elevada adherencia de macrófagos es debida a un incremento en los niveles de adrenalina, liberada con el ejercicio físico. Como se comentó anteriormente, con el estrés se produce la activación del S N simpático, seguido por una liberación de las catecolaminas (44). Dicha capacidad de adherencia parece estar mediada por una quinasa dependiente de AMPc, que es activada por la adrenalina (71).

En relación al número de linfocitos peritoneales, hemos encontrado un aumento significativo, tras el estrés por actividad física aguda (grupos AM y AE). Como se comentó en la Introducción, la mayoría de los autores coinciden en encontrar un aumento en el número de linfocitos circulantes inducido por la actividad física (23,72,10), esta linfocitosis se atribuye a una redistribución de los linfocitos desde regiones de bajo flujo sanguíneo (7) y parece ser mediada por la acción de la adrenalina liberada por la actividad física (72). No obstante tal hecho, depende del tipo de actividad física; así el aumento es más evidente cuando la misma es de corta duración pero intensa. Esta linfocitosis podría explicar el que se produzca una mayor salida desde el compartimento intravascular al peritoneal (73). Resultados similares a estos, han sido encontrados anteriormente en nuestro equipo de investigación en cobayas machos jóvenes, tras una situación de estrés producida por otro tipo de actividad física: la natación (22).

Respecto al número de células de los órganos inmunocompetentes (bazo, ganglios y timo), éstos resultados se discuten conjuntamente con el peso de dichos órganos, ya que es conocido, que el peso de los mismos está relacionado con el número de células que contienen (74).

En el bazo se observa un aumento en el número de linfocitos en todos los grupos experimentales con excepción del de entrenamiento, aumento que no se traduce en un mayor peso de este órgano. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gisler y cols (74), los cuales observaron bien ausencia de variación en el peso relativo del bazo, o bien un aumento del mismo, en ratones sometidos a estrés, a los que extrajeron el órgano inmediatamente después de finalizar dicha situación. El número de linfocitos de ganglios muestra un aumento en el grupo CT, sin embargo el peso de dicho órgano no muestra variaciones significativas en este grupo respecto a controles.

Por tanto, según nuestros resultados, el bazo y los ganglios parecen tener un cierto papel en la redistribución de linfocitos circulantes que ocurre con ejercicio físico y situaciones estresantes (73). En dicha redistribución juegan un papel muy importante los glucocorticoides liberados con el estrés, ya que regulan los ritmos circadianos normales de recirculación linfoide (75). El aumento en el número de linfocitos encontrado en el presente trabajo coincide con los resultados de algunos autores, que encuentran que la linfocitopenia en sangre inducida por glucocorticoides, es debida a una redistribución de los linfocitos circulantes a tejidos linfoides como bazo ó ganglio (76). Teniendo en cuenta que nuestros grupos experimentales han sido sometidos a estrés agudo, o a estrés repetido durante un corto periodo, parece lógico, que las variaciones en el número de linfocitos no se correspondan con variaciones en el peso del órgano, ya que la exposición al estrés es demasiado corta, para apreciar cambios a ese nivel. En cuanto a los resultados referentes al número de linfocitos de timo, éstos muestran una disminución estadísticamente significativa en los grupos CT, AE y EN. Respecto al peso tímico, se

observan disminuciones significativas en los grupos CT y AM, lo que se corresponde con una disminución en el número de células para el grupo CT, pero no así con el AM. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gisler y cols., (74) que observaron como, o bien no se producían modificaciones en el peso relativo de este órgano, o bien, se apreciaba una tendencia a disminuir cuando es extraído inmediatamente después del estrés. En nuestro equipo de investigación también hemos obtenido anteriormente similares resultados (73). Numerosos autores apuntan la idea de que los glucocorticoides, como consecuencia de la redistribución de linfocitos, producen atrofia en timo (77,46). Los glucocorticoides afectan a la timopoyesis (78), inducen linfopenia como resultado de una redistribución de linfocitos T y linfocitos (79), activando el mecanismo de apoptosis por el cual los glucocorticoides producen involución del timo (52).

Como resumen de este apartado, se puede concluir que la actividad física estresante, en general, produce una disminución en el número de macrófagos peritoneales y un aumento en el número de linfocitos de la misma localización. Respecto a los órganos inmunocompetentes parece que todos están implicados en la redistribución linfoide tras la realización de actividad física estresante. En general, se observa un aumento en el número de linfocitos en bazo y ganglios, y una disminución en peso y concentración celular en timo.

4.3. Efecto de la actividad física como modelo de estrés, en el proceso fagocítico de la macrófagos peritoneales

Los fagocitos estudiados fueron los macrófagos, los más activos en tejidos, y de ellos se eligieron los peritoneales, población representativa de las otras poblaciones macrofágicas (80) y de fácil accesibilidad. Se estudiaron en estas células las distintas etapas que conforman el proceso fagocítico: movilidad dirigida o quimiotaxis, ingestión de partículas extrañas y destrucción del material ingerido.

En relación a la capacidad de movimiento del macrófago hacia el foco inflamatorio en respuesta a una gradiente quimiotáctico (quimiotaxis), propiedad que acontece en primer lugar en el proceso fagocítico (81), dicha capacidad fue inhibida con la actividad física estresante, disminuyendo con el ejercicio de forma proporcional a la intensidad del mismo. Experimentos anteriores, realizados por nuestro grupo sobre esta propiedad de macrófagos peritoneales muestran como, generalmente, no se aprecian modificaciones tras la realización de ejercicio físico estresante (73,12). Sin embargo, en todos estos estudios el modelo de estrés empleado es la natación, modelo que origina un nivel menor de estrés que el empleado en el presente trabajo. En individuos con alto grado de estrés como los deportistas de élite, también aparece una menor capacidad de quimiotaxis respecto a individuos sedentarios (82).

Por otro lado, numerosos autores han encontrado que la quimiotaxis de monocitos se encuentra inhibida *in vitro* por los glucocorticoides a concentraciones farmacológicas (83,84). Incluso se ha encontrado que el CRF inhibe *in vitro* la quimiotaxis de monocitos (85). La significativa disminución en esta capacidad de quimiotaxis con el ejercicio agudo se corresponden con niveles elevados de corticosterona, por tanto parece que se produce una inmunosupresión asociada a la liberación de corticosteroides tras la realización de la actividad física estresante aquí utilizada (carrera en tapiz rodante).

La capacidad de ingestión de partículas inertes se encuentra significativamente inhibida con los ejercicios agudos AM y AE, recuperándose los valores controles en el grupo sometido a entrenamiento. Estos resultados coinciden con los de otros autores, así Novikov y Arzumanov (21) observaron que la actividad fagocítica va disminuyendo progresivamente dependiendo del aumento de la intensidad del ejercicio. Otros autores sin embargo, encuentran estimulada la capacidad de fagocitosis tras la realización de actividad física aguda, tanto en neutrófilos humanos (85,15), como en macrófagos peritoneales murinos (19,72). No obstante, estos últimos estudios utilizan un modelo de ejercicio físico distinto al nuestro: la natación.

En la menor capacidad fagocítica observada, podrían estar implicados los glucocorticoides. Numerosas evidencias apoyan este hecho: glucocorticoides *in vitro* retrasan los mecanismos de fagocitosis de neutrófilos (77) e inhiben esta capacidad en monocitos (83,84). Según Berczi (77), esta inhibición de la función de fagocitos mono- y polimorfonucleares, contribuye a los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios de los glucocorticoides. Esto, se correspondería con nuestros resultados, ya que en todos los grupos donde se observa inhibición en fagocitosis, se encuentran niveles elevados de corticosterona plasmática.

En adición a esto, existen evidencias de que diversas hormonas liberadas con el estrés pueden influir en la inhibición de la capacidad que se está considerando. Así, las catecolaminas tienen un efecto supresor (77). El isoproterenol (agonista β -adrenérgico) aumenta el AMPc en macrófagos y suprime su capacidad de fagocitar agregados de γ -globulinas (87). El tratamiento con ACTH produce una función fagocítica debilitada en neutrófilos humanos (88) y la administración de opioides conlleva una disminución en la fagocitosis de neutrófilos (89).

A la vista de estos datos, parece que en la inmunosupresión de la capacidad fagocítica de macrófagos tras ejercicios agudos podrían estar implicados además de los glucocorticoides, numerosas hormonas y factores liberados con la situación de estrés.

Cuando los animales son sometidos a un periodo de entrenamiento, se recuperan los valores controles, hecho que ha sido confirmado por numerosos autores (90,22,91). Estos resultados contribuyen a la idea de la adaptación a la situación de estrés que acontece en los animales sometidos a entrenamiento, y por tanto, los efectos observados en la función inmune, se deben al ejercicio en sí.

La reducción del NBT es llevada a cabo mediante el anión superóxido generado en el estallido respiratorio con el que reacciona equimolecularmente (92), y es indicativo tanto del metabolismo basal, que produce NADPH a través de la vía de las pentosas-fostato, sustrato de la enzima NADPH oxidasa (93,94), como de la capacidad de digestión de los macrófagos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una estimulación en la reducción del NBT con los ejercicios agudos, tanto en las muestras estimuladas como en las no estimuladas. Los grupos entrenados muestran valores próximos al control sin modificaciones significativas. Estos resultados coinciden con los de numerosos autores. Así, Fehr y cols. (19,86) encontraron un aumento de actividad de enzimas digestivas en macrófagos murinos y humanos tras actividad estresante, y Coe y cols. (95) detectaron un aumento en la

capacidad oxidativa de macrófagos, en monos, tras situaciones de estrés. También en nuestro equipo de investigación se ha obtenido un aumento en la reducción de NBT tras ejercicio agudo en ratones (59), cobayas (22) y humanos (15). Según Smith y cols. (4) tras una hora de ejercicio físico, aumenta la producción en neutrófilos de especies reactivas de oxígeno y ésta producción es menor en individuos entrenados, respecto a los no entrenados. En los resultados del presente trabajo se obtiene también un aumento tanto en el metabolismo basal (muestras no estimuladas) como en la capacidad de digestión (muestras estimuladas) de macrófagos peritoneales con actividad estresante, esto es, con altos niveles de corticosterona. Se puede deducir por tanto, que la corticosterona no ejerce un efecto inmunosupresor a este nivel de la respuesta inmune, sino por el contrario es estimuladora de radicales libres. Además, este aumento en la capacidad oxidativa en macrófagos, puede estar influido, por otros factores liberados con las situaciones de estrés, como la β -endorfina; según Sharp y cols., (96) la β -endorfina y la dinorfina estimulan la producción del radical O_2^- en leucocitos polimorfonucleares.

Por tanto, los resultados obtenidos en relación al proceso fagocítico de macrófagos peritoneales, sugieren que el ejercicio agudo estresante inhibe la capacidad de movilidad y fagocitosis; sin embargo, se produce una activación metabólica de los macrófagos, con mayor producción de radicales libres. El aumento de radicales libres, necesario para la función digestiva (97), puede ser nocivo para la célula (98). La existencia de niveles adecuados de antioxidantes evitaría tales daños, y aunque en este trabajo no se han valorado los antioxidantes celulares, trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación muestran como con el ejercicio, se produce un aumento en los niveles de ácido ascórbico en macrófagos peritoneales (72).

Es posible, que los factores liberados con el estrés, como la corticoesterona, estén afectando al citoesqueleto, que se sabe interviene en la movilidad e ingestión de los fagocitos (94,17), produciendo una disminución en las capacidades que dependen de él y sin embargo, el metabolismo del macrófago presenta una activación.

4.4. Efecto de la actividad física como modelo de estrés, en la función linfoide

Los linfocitos fueron obtenidos de diferentes localizaciones como el peritoneo, ubicación compartida en igualdad numérica con macrófagos, y tres órganos linfoides: el timo, como órgano central; el bazo, como órgano hematopoyético en el ratón y los ganglios axilares, como representativos de los órganos linfoides periféricos. Se estudió su función más representativa: la capacidad de respuesta proliferativa, tanto espontánea, como estimulada con mitógenos; así como la quimiotaxis, propiedad fundamental para la recirculación de estas células por el organismo (75).

Los resultados del presente trabajo muestran una inhibición de la capacidad de quimiotaxis con los ejercicios agudos, hecho que aparece en todos los órganos. Sin embargo, el grupo sometido a EN presenta una tendencia a recuperar los valores controles.

Los datos que aporta la literatura sobre este aspecto, son prácticamente inexistentes, ya que los numerosos estudios sobre función linfoide se centran en la capacidad de proliferación en respuesta a mitógenos, mientras que los estudios referentes a quimiotaxis se han realizado en células fagocíticas. A la luz de nuestros resultados parece que se

produce una inmunosupresión de la quimiotaxis en linfocitos de bazo, ganglios, timo y peritoneo tras ejercicio agudo estresante. De nuevo esta disminución de función se corresponde con altos niveles de corticosterona, por lo tanto, la podemos atribuir a los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides liberados tras situaciones estresantes. Como se comentó anteriormente, es conocido que los glucocorticoides *in vitro* inhiben la quimiotaxis de otras estirpes celulares: monocitos, macrófagos (83,84), por tanto, la disminución de esta capacidad encontrada en linfocitos, puede ser atribuida a estas hormonas corticoadrenales. En los grupos entrenados, se encuentra de nuevo una adaptación al estrés repetido, al igual que ocurría en las demás funciones inmunes discutidas anteriormente.

En relación a la capacidad de proliferación de linfocitos de los órganos inmunocompetentes, se observa que tras los ejercicios agudos se produce una disminución significativa en la capacidad de proliferación espontánea, mientras que el entrenamiento no produce modificaciones significativas en dicha capacidad. Respecto a la proliferación estimulada con Con A se produce una inhibición en dicha capacidad en bazo, ganglios y timo con todos los ejercicios agudos e incluso en el grupo sometido a entrenamiento.

Esta inhibición en la capacidad de proliferación con los ejercicios agudos coincide con numerosos resultados que aparecen en la bibliografía. Así se ha encontrado una disminución en la respuesta a mitógenos en linfocitos de individuos no entrenados tras ejercicio submáximo (98). Estos autores encuentran que con sólo 15 min de bicicleta disminuye la reactividad de linfocitos periféricos a Con A. Igualmente, en ratones se ha observado que el ejercicio exhaustivo produce una marcada disminución de la respuesta proliferativa a PHA (29), incluso en ratas tras una sólo sesión de natación (47).

En general, la respuesta *in vitro* de linfocitos a mitógenos disminuye tras exposición aguda a variedad de agentes estresantes como ruido, aislamiento, ejercicio físico (99,100,101). El shock eléctrico, que ha sido el agente estresante más estudiado, produce una disminución en la proliferación de linfocitos en respuesta a PHA (102). Lysle y cols. (103) también encontraron que una sola sesión de una hora de "shock" era suficiente para disminuir la respuesta proliferativa a Con A, en linfocitos de bazo y sangre periférica.

Por otro lado, muchas investigaciones muestran que el estrés induce disminución en la producción de IL-2, interleuquina necesaria para la respuesta proliferativa de células T (104,105,106). También el shock eléctrico disminuye la expresión de receptores para IL-2 en linfocitos T, lo cual contribuye a la menor respuesta proliferativa antes comentada.

De nuevo, en estos resultados se aprecia una relación entre los niveles elevados de corticosterona y la inhibición en la función de linfocitos. Besedovsky y cols. (106) apuntan la posibilidad de que los niveles elevados de glucocorticoides pueden actuar controlando la expansión excesiva de células inmunes y de esta forma, consiguen regular la aparición de enfermedades autoinmunes y linfoproliferativas.

Por otro lado, numerosos experimentos sugieren que los estímulos estresantes inducen estas alteraciones de la función inmune a través de la activación de receptores β -adrenérgicos por las catecolaminas (103). Así se ha encontrado que la respuesta de linfocitos B a mitógenos se inhibe por catecolaminas (NA), y el shock eléctrico induce inmunosupresión de linfocitos mediado por la liberación de estas hormonas (108).

En los grupos sometidos a entrenamiento se aprecian unos valores de proliferación espontánea similares a controles, pero la respuesta proliferativa a mitógenos disminuye en todos los órganos estudiados. En la literatura aparecen resultados similares, esto es, una inhibición de la linfoproliferación en respuesta a mitógenos tras entrenamiento (109). En nuestro grupo de investigación también se ha encontrado disminución en la función linfoproliferativa tras diversos programas de entrenamiento en tapiz rodante; si bien el ejercicio continuo produce un proceso de adaptación que se refleja en una moderada e intensa estimulación de la capacidad linfoproliferativa (29,47,26). Sin embargo, estos resultados de adaptación se producen tras sesiones de entrenamiento largas (6 semanas- 3 meses), con lo cual parece que el programa de entrenamiento empleado en el presente trabajo sería bastante corto (una semana) para detectarse esta adaptación al estrés de la linfoproliferación.

De los resultados obtenidos se deduce que el tipo celular realmente afectado por el ejercicio es el linfocito, el cual resultaría más susceptible al estrés producido por la actividad física, lo que se manifiesta en su actividad más típica, la respuesta proliferativa a antígenos o mitógenos.

Estos resultados de linfoproliferación se relacionan con los niveles de corticosterona: así los altos niveles de esta hormona encontrados en los ejercicios agudos se corresponden con una baja respuesta linfoproliferativa. Sin embargo, los grupos EN que presentaban niveles normales de corticosterona, muestran una proliferación espontánea normal, aunque la proliferación en respuesta a mitógenos está disminuida. Esto podría ser debido a que se trata de un programa corto de entrenamiento, en el cual, los linfocitos (tipo celular más sensible al estrés y al ejercicio físico) no se han adaptado a esta situación estresante que crea la actividad física.

4.5. Discusión general

La interacción entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino, esta generalmente asociada a los efectos marcados del estrés en la inmunidad. El eje H-H-A es la llave en las respuestas al estrés y sirve de prototipo para la coordinación de la información neural en respuestas fisiológicas (40). Los efectos inmunosupresores de glucocorticoides son el mayor mediador en la relación SI - SNC (52). Los corticosteroides inhiben la cascada inmune a múltiples niveles, desde la presentación antigénica, hasta la función de células efectoras, y esencialmente induce un estado de inmunotolerancia temporal (52).

En adición a esto, muchos parámetros de la inmunidad pueden estar influenciados por otros mediadores neuroendocrinos del estrés, como: catecolaminas (110,111), opioides endógenos (96) y hormonas sexuales (estrógenos, andrógenos) del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (112,113). Todos estos moduladores de la función inmune actúan vía receptores específicos que están presentes en linfocitos (114) y en macrófagos (115).

Como resumen de nuestros resultados, podemos comentar que la carrera en tapiz rodante aguda, en diversas condiciones de velocidad e intensidad, produce un estrés en los ratones que se traduce en unos niveles elevados de corticosterona y una inhibición en la mayoría de las etapas del proceso fagocítico, así como una marcada disminución

de la capacidad linfoproliferativa. El ejercicio repetido durante una semana, provoca una adaptación a la situación de estrés que se refleja en unos niveles normales de corticosterona, de las distintas etapas del proceso fagocítico y de la recirculación linfoide, aunque la linfoproliferación en respuesta a mitógenos se mantiene inhibida, por ser ésta la función y la estirpe celular más susceptible al estrés producido por la actividad física.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda técnica recibida de I. García. Así como las subvenciones del CSD, de la CICYT (SAF 92-0476) y del FISs (96-1059).

6. BIBLIOGRAFÍA-REFERENCIAS

1. FITZGERALD L. Exercise and the immune system. *Immunol. Today*. 1988, 11: 337.
2. PEDERSEN B.K. y ULLUM H. Exercise and immunity-Mechanisms of action. *Med. Sports Sci.* 1992, 26:140-146.
3. FITZGERALD L. Overtraining increases the susceptibility to infection. *Int. J. Sports Med.*, 1991, 12:S5-S8.
4. SMITH J.A., TELFORD R.D., MASON I.B. y WEIDENANN M.J. Exercise, training and Neutrophil Microbicidal Activity. *Int. J. Sports Med.* 1990, 11: 179-187.
5. SHARP N.C.C. y KOUTEDAKIS Y. Sport and the overtraining syndrom: immunological aspects. *British Med. Bull.*, 1992, 48:518-533.
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. 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.*, 1991, 12:276-280.
8. HACK V., STROBEL G., RAU J. 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.
9. CANNON I.G. Exercise and resistance to infection. *J. Appl. Physiol.*, 1993, 74:973-981.
10. BOAS S.R., JOSWIAK M.L., NIXON P.A., KURLAND G., O'CONNOR M.J., BUFALINO K., ORENSTEIN D.M. y WHITESIDE T.L. Effects of anaerobic exercise on the immune system in eight to seventeen-year-old trained and untrained boys. *J. Pediatr.*, 1996, 129:846-855.
11. 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.* 1993a, 66: 60-64.
12. RODRIGUEZ A.B., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. Phagocytic function and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils in the presence of N-formimidoyl thieramycin. *Agents Actions* 1990, 30: 86.
13. 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. Immunol. Infect. Dis.* 1990, 13(4): 189-198.
14. ORTEGA E., COLLAZOS M.E., BARRIGA C., y DE LA FUENTE M. Stimulation of phagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1992b, 64: 323- 327.

15. ORTEGA E., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. Study of the phagocytic process in neutrophils from elite sportswomen. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1993b, 66: 37-42.
16. DE LA FUENTE M., MARTIN M.I. y ORTEGA E. Effects of physical exercise on the phagocytic function of peritoneal macrophages from Swiss mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1993,16:29-37.
17. SILVERSTEIN S.C., GREENBERG S., DI VIRGILIO F. y STEINBERG T.H. Phagocytosis. En: *Fundamental Immunol.* (2ª Edit.) pp703. Ed: Paul W., Raven Press, 1989, New York.
18. PAPAGEORGIOU N., DURHAM S., WALSH G., LEE T. , CARROLL M y KAY A. Complement receptor enhancement as evidence of neutrophil activation after exercise-induced asthma. *Lancet* 1983, 26: 1220.
19. FEHR H.G., LOTZERICH H. y MICHNA H. The influence of physical exercise on peritoneal macrophage functions: histochemical and phagocytic studies. *Int. J. Sports Med.* 1988, 9: 77.
20. EBERHARDT A. Physical exercise and immunity studies and monographs of the academy of physical education. *Warszawam* 1982,47.
21. NOVIKOV V. y ARZUMANOV A. Dependence of immunological alterations in sportsmen on the intensity of physical exercise. *Teor. Prakt. Fiz Kult.* 1982, 8: 29.
22. ORTEGA E., COLLAZOS M.E., BARRIGA C. y DE LA FUENTE M. Effect of physical activity stress on the phagocytic process of peritoneal macrophages from old guinea pigs. *Mech Ageing Dev.* 1992a, 65: 157-165.
23. KEAST D., CAMERON K. y MORTON A.R. Exercise and the immune response. *Sports Med.* 1988, 5: 248.
24. FRY RW., 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 diferent intensities. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 1992a, 64:218-227.
25. FRY R.W., MORTON A.R. Y KEAST D. Acute intensive interval training and T-lymphocyte function. *Med. Sci. Sport Exerc.*, 1992b, 24:339-345.
26. THARP G.D. y PREUSS T.L. Mitogenic response of T-lymphocyte to exercise training and stress. *J. Appl. Physiol.*, 1991, 70(6): 2535-2538.
27. VERDE T.J., THOMAS S.G., MOORE R V.W., SHEK P. y SHEPHARD R.J. Immune responses and increased training of the elite athlete. *Am. Physiologic. Soc.*, 1992.
28. HEDFORS E., HAM G., IVANSEN M. y WAHREN J. Physiological variation of blood lymphocyte reactivity:T-cell subsets, and K lymphocytes during prolonged exercise. *J. Clin. Lab. Immunol.* 1978,1:159.
29. 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 Dev.*, 1992, 65:177-186.
30. SELYE H. The significance of the adrenal for adaptación . *Science.* 1937, 85: 247.
31. SELYE H. The general adaptation syndrome and the disease of adaptation. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1946, 6: 117-121.
32. ARMARIO A., CASTELLANOS J.M. y BALASCH J. Chronic and acute stress interrelationship, corticosterone response. *Horm. Metab. Resp.* 1981,13: 413-414.
33. YEY K.Y. Corticosterone concentrations in the serum and milk of lactating rats: parallels changes after induced stress. *Endocrinol.* 1984,115: 1364-1370.
34. GOLDTEIN D.S. Stress- induced activation of the sympathetic nervous system. *Baillieres. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1987, 1: 253-278.
35. ELIASSON K. Stress and catecholamines. *Acta Med. Scand.* 1984, 215: 197-204.

36. VUGEL V.H. Coping, stress, stressors and health consequences. *Neuropsychobiol.* 1985, 13:129.
37. BESEDOVSKY H.O., SORKIN E., FELIX D. y HAAS H. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur. J. Immunol.* 1977, 7:323-325.
38. BESEDOVSKY O.H., y DEL REY A. Immune-Neuroendocrine communication: Key role of interleukin-1 in interactions among CNS neuroendocrine and immune systems. Ed. Hadden.pp191, 1989, Rome-Milan
39. HOFFMAN-GOETZ L. y PEDERSEN B.K. Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Immunol. Today.* 1994,15: 382-7.
40. BLALOCK J.E. The syntax of immune- neuroendocrine communication. *Immunol. Today.* 1994, 15 (11): 504-510.
41. BESEDOVSKY U.O. y DEL REY A. Immune -Neuroendocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Rew.* 1996, 17:64-102.
42. HANDZEL Z.T. y BUCHNER V.C. Stress and the Immune response. Spierer Z., Roifman C.M., Branski D. (Ed): *Pediatric Immunology Pediatr. Adolesc. Med. Basel* pp3: 210-221, 1993, Karger.
43. DANTZER R. Y KELLEY K.W. Stress and immunity: an integrated view of relationship between the brain and the immune system. *Life Sci.* 1989, 44: 1995-2008.
44. CARVAJAL C., SERRANO M. y CERVERA S. Estrés e Inmunidad. *Cienc. Med.* 1988, 1: 46-58.
45. ARMARIO A. y CASTELLANOS J. M. Effect of acute and chronic stress on testosterone secretion in male rats. *J. Endocrin. invest.* 1984, 7: 659-661.
46. REHULKA J. Effect of repeated stress and administration of phenobarbital on the lymphoid tissue and on protein metabolism in the lymphocyte of infant and adult rats. *Physiol. Bohemoslov.* 1988, 37: 57-65.
47. FERRY A., WEILL B., AMIRIDES I., LAZIRY F. y RIEN M. Splenic immunomodulations induced stress in rats . *Immunol. letters.* 1991, 29: 261-264.
48. FERRY A., WEILL B. y RIEN M. Immunomodulations induced in rats by exercise on a treadmill. *J. Appl. Physiol.* 1990, 69 (5): 1912-1915.
49. ROBERTSON A., RAMERAR C., POTTS J. y GIBBS M. The effect of strenuous physical exercise on circulating blood lymphocytes and serum cortisol levels. *J. Clin. Immunol.* 1981, 5: 53.
50. MACKINNON L. y TOMASI T. Immunology of exercise. *Annals Sports Med.* 1986,3(1):1.
51. SCHLEIMER R.P., Effects of glucocorticoids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990, 141:559-866.
52. 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.
53. SCHLEIMER R.P., FREELAND H.S., PETERS S., BROWN K. y DERSE C. 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.
54. FORNER M.A., COLLAZOS ME., BARRIGA C., DE LA FUENTE M., RODRIGUEZ AB. y ORTEGA E. Effect of age on adherence and chemotaxis capacities of peritoneal macrophages. Influence of physical activity stress. *Mechan Ag. Develop.* 1994, 75: 179-89.
55. BESEDOVSKY H.O., DEL REY A. y SORKIN E. Lymphokine containing supernatants from Con A stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J. Immunol.* 1981, 126: 385.

56. SKLAR L.S. y ANISMAN H. *Science*. 1979, 205: 513-515.
57. DE LA FUENTE M., ALONSO M.C., SOLANA R. y PEÑA J. Macrophage and lymphocyte antibody-dependent cellular cytotoxicity in spontaneous leukemogenesis of AKR/J mice. *Tumor Biol.*, 1989, 10:310-315.
58. DE LA FUENTE M. Changes in the macrophage function with ageing. *Comp. Biochem. Physiol.* 1985, 81A:935-938.
59. DE LA FUENTE M., ORTEGA E. y MARTIN M.I. Effect of physical exercise on the phagocytic function of murine macrophages. *Microbiol. Immunol.* 1991.
60. PAUL W.E. The immune system: an introduction in fundamental immunology. Ed. Paul W.E. Raven Press. 1989, N. Y.
61. UNANUE E.R., ALLEN P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 1987, 236: 551-557.
62. SALIT M. Exercise and Immunity. En: *Drugs, athletes and physical performance*, 1988.
63. BLALOCK J.E., HARBOUR-MCMENAMIN D. y SMITH E.M. Peptide hormone share by the neuroendocrine and immunologic systems. *J. Immunol.* 1985, 135:858-861.
64. ADER R., FELTEN, D., y COHEN N., Interactions between the brain and the immune system. *Annv. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990, 30: 561-602.
65. 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.
66. KHANSARI D.N., MURGO A.J., FARTH R.E. Effect of stress on the immune system. *Immunol. Today.* 1990, 11(5): 170-175.
67. CAREN L.D. Effect of exercise on the human immune system. *Bioscience.* 1991, 41 (6): 410-414.)
68. BECKER B.A., TERD J.J., CHRISTENSON R.K., MANAK R.C., y cols. Cortisol response of gilts in tether stalls. *J. Anim. Sci.* 1985, 60: 264-270.
69. PORTA S., EMSENHUBER W., PETER W., PURSTNER P y cols. Detection and evaluation of persisting stress- induced hormonal disturbances by a post stress provocation test in humans. *Life Sci.*, 1991, 53: 1583-1589.
70. RUSHEN J., SCHWARXE N., LADERVIG J. y FOXCROFT G. Opioid modulation of the effects of repeated stress on ACTH, cortisol, prolactin and growth hormone in pigs. (1993).
71. EULER U.S. Sympatho- adrenal activity in physical exercise. *Med. Sci. Sport* 1974, 6: 165-173.
72. HANSEN J.B. WILSGARD L. y OSTERNOL B. Biphasic changes en leukocytes induced by strenuous exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1991, 62: 157.
73. ORTEGA E. Estudio comparado del efecto de la actividad física en células fagocíticas, poblaciones celulares y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Influencia de la edad. Tesis Doctoral. (1991).
74. GISLER R.H., BUSSARD A.E., MAZIE J.E. y HESS R. Hormonal regulation of the immune response induction of an immune response in vitro with lymphoid cells from mice exposed to systemic stress. *Cell Immunol.* 1971, 2: 634.
75. OTAWAY C.L. y HUSBAND A.J. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Inmunol. Today.* 1994, 15 (11): 511-517.
76. MUKWAYA G. Immunosuppressive effects and infections associated with corticosteroid therapy. *Pediatr. Infect Dis. J.* 1988, 7: 499-504.
77. BERCZI I. Immunoregulation by neuroendocrine factor. *Dev. Commp. Immunol.* 1989, 13: 329-341.
78. CUPPS T.R. y FAUCI A.S. Corticosteroid-mediate immunoregulation in man. *Immunol.Rev.* 1982, 65: 13.

79. SHINKAI S., WATANABE S., ASAI H. y SHEK P.N. Cortisol response to exercise and post-exercise suppression of blood lymphocyte subset counts. *Int. J. Sports Med.*, 1996, 17, 597-603.
80. UNANUE E.R. Macrophages, antigen - presenting cells and the phenomena of antigen handling and presentation. *Fundamental Immunol.* 2^o Edit. 95. Ed. Paul W. Raven Press , 1989, New York.
81. DOHERTY D.E., HASLETT C., FONNESEN M.G. y HENSON P.M. Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium. *J. Immunol.*, 1987, 138:1762-71.
82. FERRANDEZ M.D. y DE LA FUENTE M. Estado inmunológico de deportistas de alta competición. *Investigación y Ciencias del Deporte*, Ministerio de Educación y Ciencia, Consejo Superior de Deportes, 2: 54-98. (1995).
83. RINEHART J.J., BALCERZARK S.P., SAPONE A.L. y LOBUGIO A.F. Effect of corticosteroids on human monocyte function. *J. Clin. Invest.* 1974, 54: 1337.
84. RINEHART J.J., SAPONE A.L., BALCERZAK S.P. ACKERMAN G.A. y LOBUGLIO. AME. Effect of corticosteroid therapy in human monocyte function. *New. Engl. J. Med.* 1975, 292: 236.
85. STEPIEN H., ZELAZOWSKI, P., PAWLKOWSKI, M. y DOHLER K.O. Corticotropin-releasing factor (CRF), suppression of human peripheral blood leukocyte chemotaxis. *Neuroendocrinol. Lett.* 1987, 9: 225-230.
86. FEHR H., LOTZERICH H. y MICHNA H. Human macrophage function and physical exercise phagocytic and histochemical studies. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1989, 58: 613.
87. KOFF W.C. y DUREGAN. Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. *J. Immunol.* 1985, 135: 350-354.
88. MILLER D.R. y KAPLAN H.G. Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. *Pediatrics* 1970, 45: 861.
89. YAHYA M. D. y WATSON R.R. Immunomodulation by morphine and marijuana. *Life Sci.* 1987, 41: 2503-2510.
90. NORTHOFF H. y BERG A. Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. *Int. J. Sports Med.* 1991, 12: 9-15.
91. 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. *Mechan. Ag. Develop.* 1993c, 70: 53-63.
92. BAGASRA O., HOWEEDY A. y KAJDACACSY-BALLAA. Macrophage function in chronic experimental alcoholism. Modulation of surface receptors and phagocytosis. *Immunol.* 1988, 65: 405-409.
93. GOLDSTEIN I.H., CERQUEIRA M., LINDS S. y KAPLAN H.B. Evidence that the superoxide generating system of human leukocytes is associated with the cell surface. *J. Clin. Invest.* 1977, 59: 249.
94. HASLETT C., SAVILL J.S. y MEAGHER L. The neutrophil. *Current Opinion in Immunology* 1989, 2: 10.
95. COE C.L., ROSENBERG I.T., LEVINE S. Prolonged effect of psychological disturbance on macrophage chemiluminescence in the squirrel monkey. *Brain Behav. Immunol.* 1988, 2: 151-160.
96. SHARP B.M., KEAVE W.F., SUH H.J. y cols. Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *Endocrinology.* (Baltimore). 1985, 117: 793-795.
97. KAUFFMAN S.H.E. Immunity to bacteria and fungi. *Current Opinion in Immunology.* 1989, 1: 431. (1989).

98. HEDFORS E., HOLM G. y OHNELL B. Variations of blood lymphocytes during work studied by cell surface markers, DNA synthesis and cytotoxicity. *Cell Exp. Immunol.* 1976, 24: 328.
99. MONJAN A. y COLLECTOR M.I. Stress-induced modulation of the immune response. *Sci.* 1976, (196): 307.
100. RINNER I., SCHAUENSTEIN K., MANGGE H. y PORTA S. Opposite effects of mild and severe stress on *in vitro* activation of rat peripheral blood lymphocytes. *Brain Behav. Immunol.* 1992, 6: 130-40.
101. ZHA H., DING G., FAN S. Serum factors induced by restraint stress in mice and rats suppresses lymphocyte proliferation. *Brain Behav. Immunol.* 1992, 6: 18-31.
102. KELLER S.J., WEISS S., SCHLEIFER N., MILLER y STERN M. Suppression of immunity by stress: effect of a graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat. *Science Wash. DC.* 1981, 213: 1397.
103. LYSLE D.T., LYTE M., FOWLER H. y RABIN B.S. Shock induced modulation of lymphocyte reactivity: suppression, habituation and recovery. *Life Sci.* 1987, 41: 1805-1814.
104. BATUMAN O. D., SAJEWSKI D., OTTENWELLER J. E., PITMAN D.L., NATELSON B.H. Effect of repeated stress on T cell numbers and function in rats. *Brain Behav. Immunol.* 4: 105-117. (1990).
105. HARDY L.A. A catastrophe model of performance in sport. *Stress and performance en sport* Willey 81-106. (1990).
106. WEISS J.M., SUNDAR S.K. y BECKER K.J. Stress-induced immunosuppression and immunoenhancement: cellular immune changes and mechanisms. *Neur. Netw. Physiol. Dis.* 1989, 193-206.
107. BESEDOVSKY H.O., DEL REY A. y SORKIN E. Immuno-neuroendocrine interactions. *J. Immunol.* 1985, 135: 750S-754S.
108. WAN W., VRIEND C.Y., WETMORE L., GARTNER J.G., GREENBERG A.H. y NANCE D.M. The effects of stress on splenic immune function are mediated by the splenic nerve. *Brain. Research Bulletin* 1993, 30: 101-105. (1993).
109. ESKOLA J.O., RUUSKANEN E., SOPPI M.K. VILJANEN M., JARCINEN H., TOIVONEN H. y KOUVALAINEN K. Effect of sport stress on lymphocyte transformation and antibody formation. *Clin. Exp. Immunol.* 1978, 32:339.
110. FELTEN D., ACKERMAN D., WIEGAND S. y FELTEN S. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. *J. Neurosci. Rev.* 1987, 18: 28-36. 118-121.
111. FELTEN S. y FELTEN D. Innervation of lymphoid tissue. *Psycho neuroimmunol.* San Diego, CA. Academic Press. 2nd ed. 27. 1991.
112. GROSSMAN C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *J. Ster. Biochem* 1989,34: 241-51.
113. MC CRUDEN A. y STIMSON W. Sex hormones and immune functions. *Psycho neuroimmunol.* Pp 475-493, Acad. Press., 1991, New York. NY.
114. WYBRAN J., APPLEBLOOM T., FAMAHEY J.P. y GAVAERTS A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine enkephalin on normal human peripheral blood T-lymphocytes. *J. Immunol.* 1979, 123: 1068-1070.
115. OGUNHIYI P.O., CONTON P.D., BLACK W.D. y EYRE P. Levamisole induced attenuation of alveolar macrophage dysfunction in respiratory virus infected calves. *Int. J. Immunopharmacol.* 1988, 10: 377-385.

**ESTUDIO DE MEDIADORES
HORMONALES EN LA ESTIMULACIÓN
DE LA RESPUESTA
INMUNE INESPECÍFICA
DE MACRÓFAGOS INDUCIDA
POR EL EJERCICIO INTENSO**

*Ortega, E.
Rodríguez, A.B.
Barriga, C.*

Dirección para correspondencia:

Carmen Barriga Ibars.
Departamento de Fisiología,
Sección Biológicas.
Universidad de Extremadura,
Campus Universitario,
Avda. de Elvas s/n, 06071 Badajoz.
Tels. 924 289388
924 289035
Fax: 924 271304



Carmen Barriga Ibars: Dra. en Ciencias Biológicas por la Universidad de Extremadura es Profesora Titular de Universidad y Responsable de la Unidad de Fisiología Animal de la UEX, primer Departamento de investigación que abordó las interacciones de Ejercicio-Sistema Inmune. Dirige en la actualidad el grupo de investigación dedicado a las conexiones neuroinmunoendocrinas y sus variaciones con el ejercicio físico. Ha sido presidenta de la 1.^a Jornadas Nacionales de "Deporte y Salud: Ejercicio y Sistema Inmune" y ponente en Masters de Ejercicio Físico y Deporte impartiendo los temas de Ejercicio Físico-Sistema Inmune.



Ana Beatriz Rodríguez Moratinos: Dra. en Ciencias Biológicas por la Universidad de Extremadura, es Profesora Titular de Universidad. Sus comienzos en el campo de las interacciones neuroinmunoendocrinas se realizaron en el Dpto. de Biología Aplicada de la of Applied Biology University of Central Lancashire. En la actualidad su investigación se centra en la modulación hormonal del estrés oxidativo.



Eduardo Ortega Rincón: Dr. en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, es Profesor Titular de la Universidad UEX. Su Tesis Doctoral fue la primera en abordar las interacciones Sistema Inmune-Ejercicio Físico. Miembro Fundador de International Society of Exercise and Immunology (1993, Padeborn, Alemania). La búsqueda de mediadores neuroendocrinos implicados en la modulación del Sistema inmune por el ejercicio físico, junto con su aplicación práctica en enfermedades infecciosas tanto en deportistas de élite como en la población sedentaria que realiza ejercicio centra su investigación actual.

Resumen: El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la actividad física intensa (natación hasta el agotamiento) en ausencia o presencia de entrenamiento previo, sobre la fagocitosis y destrucción de partículas inertes por macrófagos, así como estudiar el papel de la corticosterona, la prolactina y las hormonas tiroideas como posibles mediadores hormonales. Los resultados indicaron que el ejercicio intenso provoca una estimulación tanto de la fagocitosis como de la destrucción de las partículas inertes cuando se realiza en ausencia de entrenamiento previo. Sin embargo, la natación hasta el agotamiento realizada tras un mes de entrenamiento (25 min/día) indujo un aumento en la fagocitosis pero no en la capacidad de destrucción de las partículas inertes. La corticosterona, la prolactina y las hormonas tiroideas pueden ser considerados como mediadores hormonales de la estimulación, puesto que estas hormonas incrementaron su concentración en el plasma y la incubación *in vitro* de los macrófagos con la concentración fisiológica de cada hormona detectada en el plasma tras el ejercicio también indujo una estimulación de la capacidad fagocítica de estas células.

Palabras clave: ejercicio intenso, macrófagos, fagocitosis, corticosterona, prolactina, hormonas tiroideas.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of high-intensity physical activity (swimming until exhaustion) with or without previous training on the phagocytosis and destruction of inert particle capacities of macrophages, and the role of corticosterone, prolactin and thyroid hormones as possible hormonal mediators. The results indicated that high-intensity exercise provokes a stimulation of both phagocytosis and destruction of inert particles when performed in absence of previous training. However, swimming until exhaustion after a one month training program (25 min/day) induced an increase in phagocytosis but not in the destruction of latex beads. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones can be considered as hormonal mediators of the exercise-induced stimulation of phagocytosis, since these hormones increased plasma concentration, and the *in vitro* incubation of macrophages with the same higher physiological plasma concentrations of each hormone, as after exercise, also induced phagocytic stimulation of these cells.

Key words: High-intensity exercise, macrophages, phagocytosis, corticosterone, prolactin, thyroid hormones.

1. INTRODUCCION

1.1 Introducción al estudio del sistema inmune

El sistema inmune se desarrolló, probablemente, como un recurso de autorreconocimiento y mantenimiento de la homeostasis. Como tal, es un sistema extremadamente complejo, capaz de reconocer y defender al organismo de, teóricamente, infinitos retos del entorno. Es una red que se extiende por todo el cuerpo, compuesta por médula ósea, tejidos linfoides, leucocitos circulantes y mediadores solubles (entre los que se incluyen anticuerpos, complemento, numerosas citoquinas e interferón), que funcionan coordinadamente para reconocer, englobar y destruir moléculas nuevas o extrañas, denominadas antígenos. Sin embargo, clásicamente la respuesta inmune se ha dividido en dos ramas funcionales: respuesta inmune inespecífica y específica, términos que se han seguido manteniendo de forma convencional, quizás para una mejor comprensión de la función de cada uno de los tipos celulares que intervienen en dicha respuesta. Así, la respuesta inmune inespecífica es aquella que junto a las barreras anatómicas y fisiológicas (piel, mucosa, etc) representa la primera línea de defensa del organismo. Esta respuesta se desarrolla y actúa de forma indiscriminada frente a cualquier sustancia extraña, y se lleva a cabo por polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y células NK (Natural Killer, naturales asesinas), actuando los primeros mediante la fagocitosis y el último tipo celular a través de la actividad citotóxica NK. Por otro lado, se denomina respuesta inmune específica a aquella que se desarrolla y actúa únicamente frente al antígeno que indujo su activación y en ella participan los linfocitos y sustancias liberadas por los mismos. Ambas respuestas actúan conjuntamente, ya que incluso los macrófagos intervienen tanto en la respuesta inmune inespecífica como específica, procesando el antígeno y presentándoselo a los linfocitos.

En una visión general de la respuesta inmune, ésta comienza cuando un agente invasor extraño se encuentra con fagocitos (fundamentalmente macrófagos), los cuales engloban al microbio, lo matan y degradan sus proteínas. Dichas proteínas son procesadas por el macrófago, apareciendo los determinantes antigénicos en su superficie celular en combinación con las proteínas de superficie propias de los fagocitos (proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II). Los linfocitos T colaboradores (Th) reconocen y son activados por las proteínas extrañas (determinantes antigénicos) de la superficie de los macrófagos tras su interacción. Esos Th activados a través de interleucinas estimulan entonces otras células inmunes para que proliferen y combatan los microorganismos. A su vez, otro tipo de células inmunes, los linfocitos B, producen anticuerpos contra las proteínas extrañas. Dichos anticuerpos neutralizan algunos microbios y/o estimulan la destrucción de estos por otras células inmunes. Durante el encuentro inicial con un microbio, se generan linfocitos "memoria" para responder rápidamente a la subsiguiente infección por el mismo microorganismo.

Los linfocitos T se distinguen por un receptor característico de su superficie celular (TCR, CD3), con especificidad para el reconocimiento de cada posible antígeno. Existen diferentes tipos de subpoblaciones de linfocitos T, las células T helper o colaboradoras (Th), las células citotóxicas (Tc) y las células supresoras (Ts). Estas células se diferencian por su función y sus proteínas de superficie, destacando el marcador CD4 en los linfocitos Th y el CD8 en los Tc y Ts.

Las células Th (CD4) regulan muchas de las facetas de la respuesta inmune, especialmente de células B y T. Su función concreta es reconocer, en asociación con las moléculas de la clase II del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) el antígeno y lo presentan al macrófago, el cual procede a la secreción de interleucina 1 (IL-1) responsable de la aparición de receptores para la interleucina 2 (IL-2) en las células Th (posiblemente una subpoblación distinta de la que indujo la producción de IL-1) y estimula a estos linfocitos a liberar IL-2, que a su vez inducen la proliferación de las células activadas por el antígeno, así como la activación de toda la gama de células efectoras inmunocompetentes.

Las células Tc/Ts (CD8) pueden, a su vez, ser subdivididas por sus funciones y por sus proteínas de superficie, que parecen actuar facilitando que estas células T reconozcan al antígeno en asociación con los productos de clase I del CMH, presentes en la práctica totalidad de las células nucleadas. Los linfocitos Tc se diferencian y proliferan efectuando su acción citotóxica sobre la célula diana que indujo su activación. Por su parte, los denominados linfocitos Ts ejercen un papel supresor de regulación de la respuesta inmune que se ha desencadenado en respuesta a los diferentes antígenos.

Los linfocitos B se definen clásicamente por la presencia de inmunoglobulinas endógenas (anticuerpos). Estas moléculas se hallan en la membrana superficial, en la que actúan como receptores específicos para el antígeno. Una vez reconocido el antígeno específico, los linfocitos B proliferan y se diferencian en células plasmáticas que liberarán los anticuerpos específicos frente al antígeno que indujo su activación. La iniciación de la proliferación de estos linfocitos implica no solo el reconocimiento del antígeno y de los determinantes del CMH, sino también señales transmitidas entre las células presentadoras del antígeno y los linfocitos, por medio de las interleucinas. No obstante, estas células B pueden realizar también la presentación antigénica, tras efectuar el procesamiento antigénico, a los linfocitos Th.

Las células precursoras mieloides en la médula ósea se diferencian en fagocitos, capaces de incluir, interiorizar y destruir agentes infecciosos. Los fagocitos se dividen en dos clases básicas: granulocitos polimorfonucleares neutrófilos y monocitos. Los granulocitos polimorfonucleares pueden ser neutrófilos, basófilos, eosinófilos, según las tinciones histológicas de sus gránulos, siendo los primeros los principales granulocitos con función fagocítica. Por su parte los monocitos viajan a través de la circulación a los tejidos, donde maduran hasta macrófagos. Estos constituyen los llamados "fagocitos mononucleares", siendo de crucial importancia en el inicio, regulación y ejecución de la respuesta inmune. Son tres sus principales funciones inmunológicas: (1) procesan los antígenos y presentan los epitopos esenciales a los linfocitos para facilitar la inducción a la inmunidad, (2) son células secretoras muy activas, produciendo sustancias biológicamente importantes tales como diferentes interleucinas que modulan la respuesta inmune, componentes del complemento, prostaglandinas y varias enzimas, y (3) son células efectoras que migran a los lugares de inflamación e infección, de manera menos rápida que los leucocitos polimorfonucleares, pero no obstante engloban y matan los microorganismos. Los macrófagos pueden ser activados por los linfocitos Th para aumentar su capacidad bactericida, y son particularmente importantes en la defensa contra parásitos intracelulares, incluyendo micobacterias, hongos, virus.

Existe otro grupo heterogéneo de células inmunes capaces de reconocer y matar inespecíficamente células infectadas por virus, ciertas células tumorales, y recientemente, se las relaciona también en la defensa contra el SIDA. En este tipo de células se incluyen las NK, y las Killer (K o asesinas), que realizan citotoxicidad de forma directa sobre sus células dianas (en el caso de las NK) o de forma dependiente de anticuerpo (CCDA) en el caso de células K. Las células K constituyen un mecanismo de destrucción de células con antígenos extraños en la superficie frente a los que se han producido anticuerpos. Estas células parecen ser más bien "actividades" en las que participan diferentes tipos de células inmunes.

1.2 Ejercicio y sistema inmune

Se conoce ya desde hace algunos años que la actividad física provoca cambios en el sistema inmune. Existe la creencia generalizada de que aquéllos que realizan ejercicio de forma regular son menos susceptibles a ciertas enfermedades infecciosas. La mayoría de los estudios publicados sostienen la existencia de un efecto dual del ejercicio sobre la resistencia frente a las enfermedades infecciosas: el ejercicio intenso aumenta dicha susceptibilidad mientras que el moderado la reduce (29). Sin embargo, no existe una base científica completa que mantenga esta idea. Desde 1902, sabemos que el ejercicio induce una leucocitosis (25, 30). Sin embargo, mientras que muchos trabajos de investigación han mostrado que la capacidad funcional de los linfocitos puede disminuir después de un ejercicio agudo e intenso (11, 17, 19, 41), la actividad fagocítica tanto de macrófagos (10, 12, 13, 38, 39) como de neutrófilos (26, 44) aumenta. Por ello, los fagocitos, y las defensas inespecíficas en general, incluyendo la actividad NK (8, 16, 34), juegan un papel importante en la defensa contra la infección, probablemente previniendo la entrada y mantenimiento de los antígenos en situaciones donde la respuesta inmune específica parece estar deprimida (40). No obstante, algunos investigadores, por el contrario, han indicado que la posible disminución en la capacidad de los fagocitos para destruir los patógenos en los deportistas inducido por un sobreentrenamiento podría aumentar en ellos la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (48).

Aunque los datos en la literatura científica hasta el momento indican que la fagocitosis está estimulada tras el ejercicio, incluso el intenso, el mecanismo de esta estimulación sigue sin conocerse. Una creencia generalizada entre los investigadores en el campo de la "inmunología del ejercicio" es que para explicar los posibles mecanismos a este respecto, el papel de los factores neuroendocrinos debe ser estudiado, puesto que muchas hormonas liberadas en situaciones de estrés y con capacidad inmunomoduladora se liberan con el ejercicio.

1.3. Influencia de algunas hormonas sobre el sistema inmune. Relación con el ejercicio

Durante la actividad física se produce en el organismo muchos cambios hormonales y metabólicos (1). La actividad nerviosa simpática aumenta como consecuencia de la realización de un ejercicio o la aplicación de un estrés, así como los niveles de varias hormonas en sangre, tales como la adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina), β -endorfina, vasopresina, glucagón, hormona del crecimiento, prolactina, hormona adrenocorticotropa, glucocorticoides y hormona estimulante del tiroides (1, 39). Estos cam-

bios se parecen a los efectos del estrés psicológico, puesto que en ambas situaciones, cambios en neuropéptidos, endorfinas y corticosteroides pueden afectar de forma importante al sistema inmune, aunque es menos probable que los efectos puramente psicológicos del ejercicio ejerzan influencias directas importantes en la función inmune (47).

Las células inmunes presentan receptores específicos para las distintas hormonas o péptidos neuroendocrinos con capacidad de modular la respuesta inmune. Los receptores generalmente se localizan en la parte externa de la membrana de estas células y poseen una elevada afinidad por las hormonas peptídicas; no obstante, algunas hormonas, como es el caso de las esteroideas, se introducen en la célula donde se unen a sus receptores situados en el citoplasma o en el núcleo (14). Así en las células inmunes han sido identificados receptores específicos para muchos factores neuroendocrinos, entre los que se encuentran ACTH (51), péptido intestinal vasoactivo (VIP) (45), sustancia P (31), glucocorticoides (32), prolactina (2), hormonas tiroideas (23), β -endorfina (19), hormona de crecimiento (19), catecolaminas (42), acetilcolina (6) y gran número de factores liberadores de hormonas (51). Muchos, si no todos, de estos factores neuroendocrinos, liberados en situación de estrés, afectan a algunos aspectos de la respuesta inmune. La influencia de estos factores sobre la respuesta inmune puede ser tanto estimuladora como inhibidora, dependiendo sobre todo de su concentración, célula diana y la función específica de defensa que se estudie (23).

Objetivo: En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (39, 40) hemos encontrado que el ejercicio hasta el agotamiento induce una estimulación de los macrófagos peritoneales. En este estudio nos propusimos evaluar los posibles mediadores hormonales que intervienen en esta estimulación. Para ello, en primer lugar estudiamos el efecto del plasma (como portador de los posibles mediadores hormonales de la función inmune) procedente de los animales que realizaron actividad física sobre la fagocitosis y destrucción del material ingerido. En segundo lugar se valoró las variaciones inducidas por nuestro modelo de actividad física en la concentración de algunas de las hormonas liberadas en situaciones de estrés, tales como corticosterona, T3 y T4. Finalmente, se realizó un estudio *in vitro* de cada una de estas hormonas sobre la fagocitosis y destrucción del material ingerido por los macrófagos, utilizando como concentración hormonal tanto aquella detectada previamente en el plasma de los animales (en condición basal y tras la natación forzada) como una concentración superior a ésta.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 Animales:

Los estudios fueron realizados en ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c, con una edad de 12[±].3 semanas, mantenidos a una temperatura constante de 22°C y un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales fueron alimentados con pienso estándar y agua *ad libitum*.

2.2 Actividad física:

Utilizamos un modelo clásico de estrés por actividad física, la natación hasta el agotamiento (40, 41, 11). Los animales fueron separados en tres grupos experimentales:

-Actividad física aguda (grupo AFA): los ratones fueron introducidos en piletas individuales con capacidad para 7 litros de agua (a 22° C) y fueron obligados a nadar continuamente hasta el agotamiento. La duración media de la prueba fue de 30⁺5 minutos.

-Actividad física aguda tras entrenamiento (grupo AFAE): los animales pertenecientes a este grupo fueron sometidos a un programa de entrenamiento en las condiciones anteriormente descritas durante 25 minutos cada día en un total de 30. En el último día cada ratón fue sometido a las mismas actividad física hasta el agotamiento como en el grupo APA.

-Animales controles: que fueron mantenidos en las mismas condiciones de laboratorio que los animales pertenecientes a los dos grupos anteriores pero no sometidos a actividad física.

Inmediatamente después de la finalización del ejercicio físico, los animales fueron sacrificados por decapitación. Todos los ensayos fueron realizados paralelamente en los tres grupos de animales. El número de experimentos en cada estudio está indicado en las correspondientes tablas y figuras.

2.3 Plasma:

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se recogió la sangre en tubos heparinizados que se centrifugaron a 300 x g para obtener el plasma.

2.4 Obtención de macrófagos peritoneales:

Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos de cada animal inmediatamente después del sacrificio. Paralelamente a cada animal de los grupos AFA o AFAE, un animal control de la misma edad fue sacrificado. El abdomen fue limpiado con etanol al 70%, se separó cuidadosamente la piel sin abrir el peritoneo y se les inyectó intraperitonealmente 4 ml de medio Hank's (Sigma) ajustado a pH 7.4. Se realizó un suave masaje abdominal y se recogió la suspensión peritoneal (aproximadamente el 90% del volumen inyectado). Finalmente los macrophagos fueron ajustados a 5 x 10⁵ células/ml de medio. La viabilidad celular fue del 98%, evaluada a través del test de azul tripano.

2.5 Estudio de fagocitosis:

La fagocitosis de partículas de látex fue llevada a cabo siguiendo el método descrito por De la Fuente (6). Alícuotas de 200 microlitro de la suspensión de macrófagos peritoneales fueron incubadas sobre placas de cultivo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió 20 microlitro de bolas de látex (1.09 micrometro de diámetro). Tras 30 minutos de incubación, las placas fueron lavadas, fijadas y teñidas, y se determinó en el microscopio el número de partículas ingeridas por 100 macrófagos (índice de fagocitosis).

2.6 Estudio de la capacidad microbicida:

La capacidad microbicida oxígeno-dependiente de los macrófagos se evaluó a través de la producción de anión superóxido (O₂⁻). Para ello utilizamos el test de reducción del nitro-

azul de tetrazolio (NBT), siguiendo la técnica de De la Fuente (6) con modificaciones. Alícuotas de 250 microlitro de la suspensión de macrófagos se mezclaron con 250 microlitro de NBT (Sigma, 1mg/ml). 25 microlitro de bolas de látex fueron añadidos a las denominadas muestras estimuladas y 25 microlitro de PBS a las denominadas muestras no estimuladas. Tras 30 minutos de incubación, se detuvo la reacción, se centrifugaron las muestras, se tiró el sobrenadante y se extrajo el NBT reducido mediante dioxan (Sigma). Se determinaron las absorbancias de los sobrenadantes a 525 nm utilizando dioxan como blanco.

2.7 Tratamiento de macrófagos peritoneales con plasma procedente de los animales sometidos a ejercicio sobre la fagocitosis y la destrucción de las partículas inertes por los macrófagos peritoneales:

Con anterioridad a la realización de los ensayos para evaluar la fagocitosis y la destrucción de las partículas inertes, la suspensión de macrófagos fue incubada con plasma procedente de ratones tanto del grupo AFA como del grupo AFAE, o plasma procedente de los animales controles. En el estudio de la fagocitosis, 165 microlitro de la suspensión de macrófagos ajustada se incubaron con 35 microlitro de plasma procedente de los animales controles (valores controles) o de plasma procedente de los animales sometidos a ejercicio físico, tanto en ausencia (valores PE, plasma ejercicio) como en presencia de entrenamiento previo (valores PEE, plasma ejercicio entrenados), durante 30 minutos en un baño con agitación suave.

En el estudio de la capacidad microbicida oxígeno-dependiente (producción de anión superóxido), 230 microlitro de la suspensión de macrófagos se incubaron con 20 microlitro de plasma de cada grupo de animales bajo las mismas condiciones. Después de las incubaciones, las capacidades fagocítica y microbicida se evaluaron siguiendo las técnicas anteriormente descritas.

2.8 Valoración de la concentración de hormonas:

La valoración de la concentración plasmática de las diferentes hormonas, tanto en ratones controles como en los ratones sometidos a actividad física, se llevó a cabo por radioinmunoensayo (R.I.A.).

2.9 Tratamiento de los macrófagos peritoneales con las diferentes "hormonas de estrés" sobre la capacidad fagocítica y la capacidad microbicida oxígeno-dependiente de los macrófagos peritoneales:

Para estudiar el posible papel que estas hormonas pueden jugar como mediadores de la estimulación de la capacidad fagocítica inducida por el ejercicio intenso, evaluamos *in vitro* la influencia de la corticosterona, T3, T4 y prolactina (Sigma) sobre la capacidad de fagocitosis y destrucción de las partículas inertes. Para ello evaluamos el efecto de las concentraciones fisiológicas alcanzadas en el plasma inmediatamente después de la actividad física, así como concentraciones más altas. Por tanto, estudiamos el papel de las hormonas indicadas a las siguientes concentraciones:

-Corticosterona: 82 ng/ml (concentración basal, en animales controles), 250 ng/ml (concentración alcanzada en el plasma tras el ejercicio) y 2500 ng/ml como concentración más alta que la fisiológica.

-Prolactina: 1.1 ng/ml (concentración basal, en animales controles), 2.2 ng/ml (concentración alcanzada en el plasma tras el ejercicio) y 8 ng/ml, 16 ng/ml y 22000 ng/ml como concentraciones más altas.

-T3: 1 ng/ml (concentración basal, en animales controles), 1.5 ng/ml (concentración alcanzada en el plasma tras el ejercicio) y 15000 ng/ml como concentración más alta.

-T4: 48 ng/ml, 75 ng/ml y 750000ng/ml respectivamente.

Después de la incubación de 180 microlitro o 230 microlitro (para los estudios de fagocitosis o reducción del NBT, respectivamente) de la suspensión de macrófagos con 20 microlitro de cada hormona durante 30 minutos a 37°C (obteniendo la concentración final correspondiente indicadas anteriormente en cada tubo), se realizaron los correspondientes ensayos para el estudio de la fagocitosis o reducción del NBT.

2.10 Análisis estadístico:

Todos los resultados están expresados como la media + desviación estándar del número de experimentos indicados en las tablas y figuras. En el estudio estadístico, los resultados fueron analizados mediante el test no paramétrico ANOVA-F Scheffe. $P < 0.05$ fue el mínimo nivel de significación considerado.

3. RESULTADOS:

3.1 Efecto del ejercicio intenso (natación hasta el agotamiento) sobre la fagocitosis y la destrucción de las partículas inertes.

Los resultados que se muestran en la Figura 1 y en la Tabla 1, corresponden a los Índice de Fagocitosis y a la producción de anión superóxido, respectivamente, por macrófagos peritoneales procedentes de ratones sometidos a ejercicio intenso. Inmediatamente

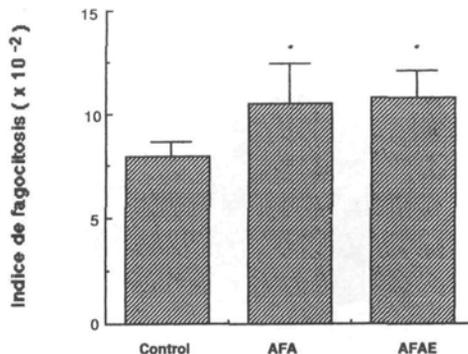


Figura 1A. Efecto de la natación hasta el agotamiento sobre la fagocitosis por macrófagos peritoneales de partículas inertes. AFA = Actividad Física Aguda; AFAE = Actividad Física Aguda con Entrenamiento. Cada valor es la media + desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ con respecto a los valores controles.

después del ejercicio se produjo un aumento ($p < 0,05$) en el índice de fagocitosis, tanto en ausencia (grupo AFA) como en presencia de entrenamiento previo (grupo AFAE). Sin embargo, una mayor ($p < 0,05$) producción de anión superóxido por los macrófagos después del ejercicio sólo fue detectada en el grupo AFA (Tabla 1A), no obteniéndose variaciones del grupo sometido a actividad física aguda con entrenamiento (AFAE) respecto al grupo control.

Tabla 1A. Efecto de la natación hasta el agotamiento en la producción de anión superóxido por los macrófagos.

	Absorbancia a 525 nm.	
	Muestras no estimuladas	Muestras estimuladas
Controles	0,036±0,004	0,060±0,003
AFA	0,042±0,008	0,081±0,012*
AFAE	0,030±0,006	0,056±0,015

Cada valor representa la medida ± desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado.

* $p < 0,05$ con respecto al grupo control.

AFA= Actividad Física Aguda, AFAE= Actividad Física Aguda con Entrenamiento.

3.2 Efecto del plasma procedente de los ratones sometidos a ejercicio sobre la fagocitosis y destrucción de las bolas de latex por los macrófagos peritoneales.

Un efecto similar al observado en los macrófagos procedentes de ratones sometidos a actividad física fue encontrado tras la incubación de los macrófagos con el plasma de los ratones que fueron sometidos a natación hasta el agotamiento. En la Figura 1B se muestran los resultados de fagocitosis de los macrófagos incubados con plasma procedente

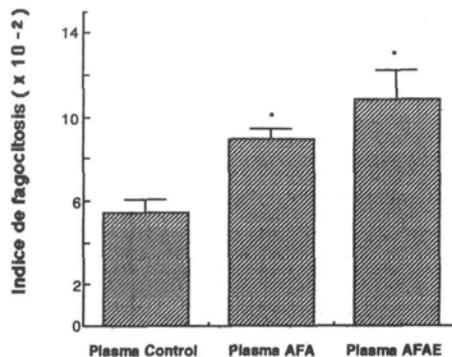


Figura 1B. Efecto de la incubación previa con plasma de ratones sometidos a ejercicio físico sobre la fagocitosis por macrófagos peritoneales de partículas inertes. AFA = Plasma de ratones sometidos a AFA; Plasma AFAE = Plasma de ratones sometidos a AFAE.

Cada valor es la media ± desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ con respecto a los valores controles.

de animales con ejercicio (Plasma AFA) y de animales sometidos a entrenamiento previo (Plasma AFAE), observándose un significativo aumento en ambos grupos respecto a los controles ($p < 0.05$). Cuando se observan los resultados de la destrucción de bolas de latex por los macrófagos peritoneales tras la incubación con los diferentes plasmas (Tabla 1B), solo en las células que fueron incubadas con plasma del grupo AFA, se obtuvo un incremento significativo ($p < 0,05$) respecto al grupo control.

Tabla 1B. Efecto del plasma procedente de ratones que realizaron ejercicio físico sobre la producción de anión superóxido por los macrófagos.

	Absorbancia a 525 nm.	
	Muestras no estimuladas	Muestras estimuladas
Plasma de controles	0,189±0,069	0,247±0,090
Plasma AFA	0,234±0,020	0,339±0,017*
Plasma AFAE	0,210±0,089	0,288±0,062

Cada valor representa la media \pm desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.5$ con respecto al grupo Plasma de Controles.

Plasma AFA= Plasma procedente de ratones sometidos a Actividad Física Aguda.

Plasma AFAE= Plasma procedente de ratones sometidos a Actitud Física Aguda con Entrenamiento.

3.3 Concentraciones plasmáticas de corticosterona, prolactina, triyodotironina (T3) y tiroxina (T4):

Las concentraciones plasmáticas de las diferentes hormonas evaluadas, tanto en ratones controles (valores basales) como tras el ejercicio (grupos AFA y AFAE) se muestran en las Figuras: 2 (corticosterona), 3 (prolactina), 4 (T3) y 5 (T4). Como puede verse, todas

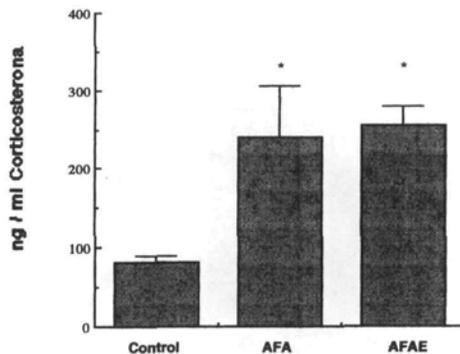


Figura 2. Concentración en plasma de la hormona corticosterona (ng/ml) procedente de ratones sometidos a AFA= Actividad Física Aguda y AFAE = Actividad Física Aguda con Entrenamiento; Cada valor es la media \pm desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ con respecto a los valores controles.

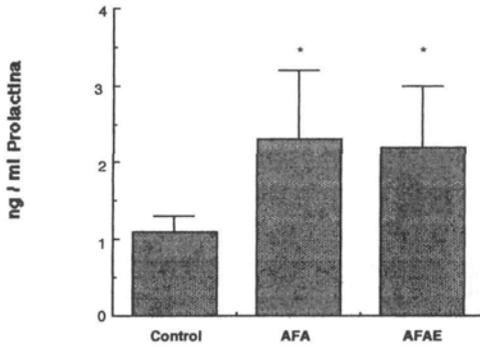


Figura 3. Concentración en plasma de la hormona prolactina (ng/ml) procedente de ratones sometidos a AFA= Actividad Física Aguda y AFAE = Actividad Física Aguda con Entrenamiento; Cada valor es la media + - desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * p < 0,05 con respecto a los valores controles.

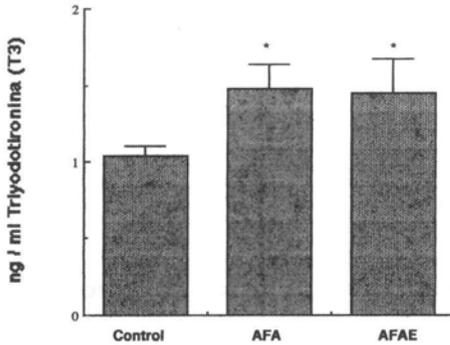


Figura 4. Concentración en plasma de la hormona triyodotironina (T3) (ng/ml) procedente de ratones sometidos a AFA= Actividad Física Aguda y AFAE = Actividad Física Aguda con Entrenamiento; Cada valor es la media + - desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * p < 0,05 con respecto a los valores controles.

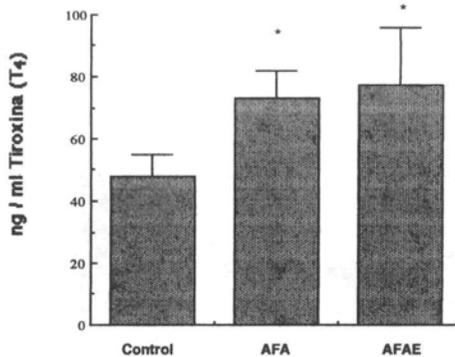


Figura 5. Concentración en plasma de la hormona tiroxina (T4) (ng/ml) procedente de ratones sometidos a AFA= Actividad Física Aguda y AFAE = Actividad Física Aguda con Entrenamiento; Cada valor es la media + - desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * p < 0,05 con respecto a los valores controles.

las hormonas evaluadas incrementaron significativamente ($p < 0,05$) su concentración en la sangre inmediatamente después de la finalización del ejercicio hasta el agotamiento, tanto en ausencia como en presencia de entrenamiento previo.

3.4 Influencia de la corticosterona, prolactina y hormonas tiroideas sobre la fagocitosis y destrucción de las partículas inertes.

Las Figuras 6, 7 y 8 muestran los resultados correspondientes a los efectos *in vitro* de la corticosterona, prolactina, y hormonas tiroideas, respectivamente, sobre la fagocitosis. Después de la incubación de los macrófagos con las concentraciones fisiológicas de las hormonas alcanzadas en el plasma tras el ejercicio, se observó un aumento ($p < 0,05$) en el índice de fagocitosis comparado con el obtenido tras la incubación con los valores basales de cada hormona (concentración de cada hormona en los animales del

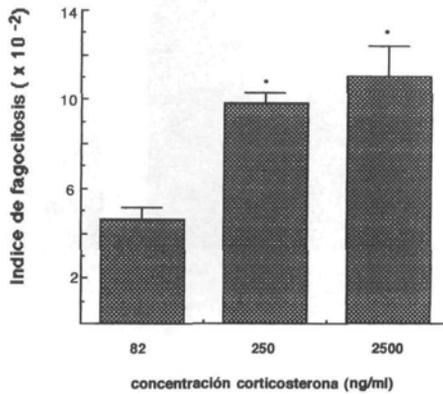


Figura 6. Influencia de la hormona corticosterona sobre la fagocitosis por los macrófagos peritoneales de partículas inertes. Cada valor es la media \pm desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ con respecto a los valores de 82 ng/ml.

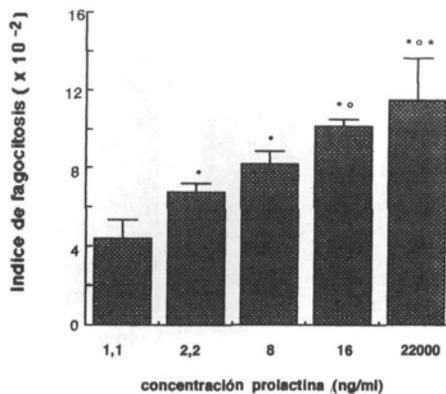


Figura 7. Influencia de la hormona prolactina sobre la fagocitosis por los macrófagos peritoneales de partículas inertes. Cada valor es la media \pm desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0,05$ con respecto a los valores de 1,1 ng/ml.; \circ $p < 0,05$ con respecto a los valores de 2,2 ng/ml.; * $p < 0,05$ con respecto a los valores de 8 ng/ml.

grupo control). Este hecho se observó con todas las hormonas estudiadas, y el efecto se mantuvo (en ocasiones con valores más altos) tras la incubación de los macrófagos con las concentraciones más altas de cada hormona. Sin embargo, en general, tras la incubación *in vitro* de los macrófagos con las distintas hormonas no se observaron diferencias en relación a la capacidad microbicida de estas células (producción de anión superóxido) (Tablas 2, 3, 4 y 5). Tan sólo fue detectado un aumento en la producción de anión superóxido tras la fagocitosis (muestras estimuladas) después de la incubación de los macrófagos con 8 ng/ml de prolactina.

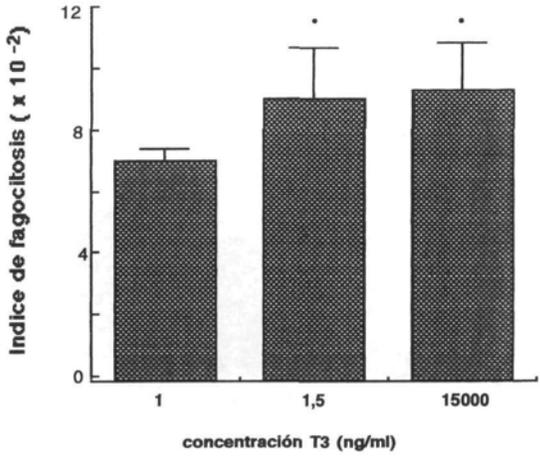


Figura 8. Influencia de la hormona triyodotironina (T3) sobre la fagocitosis por los macrófagos peritoneales de partículas inertes. Cada valor es la media + - desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. • p < 0,05 con respecto a los valores de 1 ng/ml.

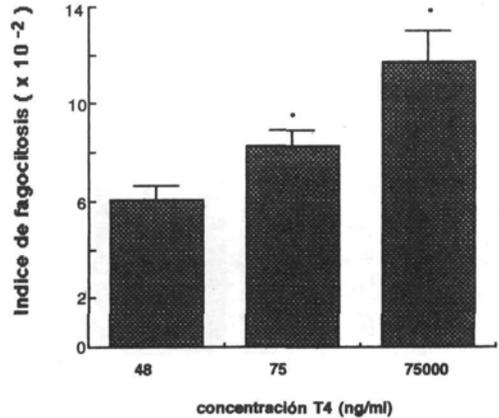


Figura 9. Influencia de la hormona tiroxina (T4) sobre la fagocitosis por los macrófagos peritoneales de partículas inertes. Cada valor es la media + - desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado. • p < 0,05 con respecto a los valores de 48 ng/ml.

Tabla 2. Influencia de la corticosterona (CTC) sobre la producción de anión superóxido por los macrófagos.

Corticosterona (ng/ml)	Absorbancia a 525 nm.	
	Muestras no estimuladas	Muestras estimuladas
82 ng/ml	0,032±0,004	0,076±0,010
250 ng/ml	0,041±0,011	0,074±0,021
2500 ng/ml	0,049±0,010*	0,082±0,016

Cada valor representa la media ± desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado.

*p<0.05 con respecto a los valores de 82 ng/ml.

Tabla 3. Influencia de la prolactina sobre la producción de anión superóxido por los macrófagos.

Prolactina (ng/ml)	Absorbancia a 525 nm.	
	Muestras no estimuladas	Muestras estimuladas
1,1	0,028±0,008	0,073±0,013
2,2	0,024±0,005	0,056±0,008
8	0,033±0,002	0,085±0,007*
16	0,025±0,003	0,084±0,005
22000	0,025±0,005	0,061±0,009

Cada valor representa la media ± desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado.

*p<0.01 con respecto a los valores de 2 y 22000 ng/ml.

Tabla 4. Influencia de T3 sobre la producción de anión superóxido por los macrófagos.

T3 (ng/ml)	Absorbancia a 525 nm.	
	Muestras no estimuladas	Muestras estimuladas
1	0,030±0,003	0,070±0,010
1,5	0,029±0,003	0,068±0,007
15000	0,030±0,006	0,066±0,007

Cada valor representa la media ± desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado.

Tabla 5. Influencia de T4 sobre la producción de anión superóxido por los macrófagos.

T4 (ng/ml)	<u>Absorbancia a 525 nm.</u>	
	<u>Muestras no estimuladas</u>	<u>Muestras estimuladas</u>
48	0,036±0,004	0,075±0,011
75	0,033±0,005	0,065±0,008
75000	0,038±0,006	0,082±0,016

Cada valor representa la media ± desviación estándar de 8 experimentos realizados por duplicado.

4. DISCUSION

Los macrófagos son una población de células adecuada para el estudio de la influencia de la actividad física sobre el sistema inmune. Estas células no sólo participan en la respuesta inmune inespecífica, sino que también intervienen en la respuesta específica como células accesorias. Aunque en algunos casos la disminución en la capacidad de respuesta inmune inducida por el ejercicio físico de alta intensidad viene dada por una menor funcionalidad de los linfocitos B y T, una inapropiada funcionalidad de los macrófagos podría contribuir a disminuir la actividad de los linfocitos. El ejercicio modula la actividad funcional de los macrófagos, incluso aumentando sus propiedades antitumorales (27,52). Además, es necesario hacer un especial énfasis en la investigación de la actividad fagocítica de estas células, puesto que son la primera barrera que se opone a los microorganismos que provocan enfermedades infecciosas en el hombre.

Es curioso que, a diferencia de la capacidad funcional de los linfocitos (11, 19), la función de los fagocitos aumenta tras el ejercicio intenso o la actividad física estresante, tanto en los macrófagos (10, 12, 13, 39, 40) como en los neutrófilos (26, 44). En este estudio hemos encontrado un aumento en la fagocitosis y en la destrucción de partículas inertes (medido indirectamente a través de la producción del anión superóxido) en los macrófagos peritoneales. Sin embargo, tras el ejercicio intenso, mientras la fagocitosis estaba estimulada tanto en ausencia como en presencia de un entrenamiento previo, la estimulación en la reducción del NBT tras la fagocitosis fue sólo detectada en ausencia de entrenamiento. Estos resultados parecen estar de acuerdo con la idea indicada por Smith y colaboradores (47) de que el ejercicio estimula la capacidad microbicida de los fagocitos, pero la posible disminución de esta capacidad en algunos atletas inducida por el sobreentrenamiento podría aumentar la susceptibilidad de los mismos para contraer enfermedades infecciosas.

El efecto del ejercicio sobre la resistencia a la infección depende de cuando el ejercicio se realiza en relación a la propia infección (21). Por ejemplo (29), un entrenamiento intenso en ratones llevado a cabo con anterioridad a la infección por el virus de la gripe induce un incremento en la supervivencia de los ratones del 25% comparado con los animales que no realizan el ejercicio (controles) pero que también son infectados con el mismo virus. Por el contrario, la natación hasta el agotamiento rea-

lizada al mismo tiempo o después de la infección provoca una disminución en el porcentaje de supervivencia del 33%. Estos resultados sugieren que el ejercicio realizado con anterioridad a la infección protege contra la misma, mientras que el ejercicio llevado a cabo durante los primeros estadios del proceso infeccioso puede reducir la resistencia a éste (29). La estimulación de la actividad fagocítica inducida por el ejercicio intenso está de acuerdo con la idea de que las defensas no específicas juegan un papel importante en la defensa contra la infección, probablemente previniendo la entrada y mantenimiento del antígeno en situaciones donde la respuesta inmune específica parece estar deprimida. Otros autores han observado en humanos que tras ejercicios de resistencia (maratón) que disminuye el número de monocitos con receptores Fc en la sangre, probablemente debido a la desaparición del torrente circulatorio de los precursores de los macrófagos, que se situarían en tejidos extravasculares incrementando allí su actividad fagocítica (18). Por tanto, la estimulación de la actividad fagocítica, e incluso el aumento de la actividad NK durante el ejercicio intenso (35), podría prevenir la infección durante este tipo de ejercicios. Sin embargo, si la infección existe con anterioridad a la realización del ejercicio, la práctica del mismo podría incrementar la infección debido a una deficiencia en la respuesta inmune específica. A este respecto, se podría considerar a la fagocitosis como un "indicador" del estado del sistema inmune en los deportistas respecto a su mayor o menor susceptibilidad a la infección durante el entrenamiento o competición deportiva.

Se ha sugerido que los efectos del ejercicio y el estrés no son distinguibles (4, 20). De este modo se postula que los factores neuroendocrinos liberados en situaciones de estrés, como el ejercicio intenso, son responsables de los cambios inducidos por este tipo de ejercicio sobre el sistema inmune. Así, la estimulación en la función no específica de los macrófagos mediante la fagocitosis inducida por la actividad física intensa podría estar mediada por las "hormonas de estrés" liberadas durante la realización de la actividad física. Esta idea fue en parte confirmada en nuestro estudio preliminar, puesto que el plasma procedente de los animales sometidos a ejercicio estimuló la fagocitosis y destrucción de las partículas inertes por los macrófagos, como ya habíamos observado tras el ejercicio hasta el agotamiento de forma directa. El aumento en la capacidad fagocítica de los macrófagos, paralelamente con un aumento en las concentraciones plasmáticas de corticosterona, prolactina y hormonas tiroideas, sugiere que estas hormonas pueden participar como mediadores de este proceso. Apoyando esta hipótesis se encuentra el hecho de que estas hormonas también indujeron una estimulación de la fagocitosis tras la incubación de los macrófagos con las concentraciones fisiológicas de cada hormona alcanzadas en la sangre inmediatamente después de la natación hasta el agotamiento. Incluso esta estimulación se mantuvo tras la preincubación *in vitro* de los macrófagos con concentraciones superiores de cada hormona. Sin embargo, en general, no observamos ningún efecto de la corticosterona, prolactina u hormonas tiroideas sobre la capacidad microbicida oxígeno-dependiente de los macrófagos. Es posible que la hormona del crecimiento (GH) intervenga en este proceso, ya que la GH aumenta su concentración durante el ejercicio intenso (29) y se ha descrito que esta hormona estimula la producción de anión superóxido en los macrófagos peritoneales (22). Además, otras sustancias, como citoquinas o mediadores inflamatorios, pueden intervenir sobre la estimulación de la capacidad microbicida de los macrófagos. De hecho, se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos de interleuquina 1 (IL-1), IL-6, receptor soluble de IL-2 y del factor necrótico tumoral (TNF) tras el ejercicio estresante (37).

La prolactina puede modular la función del macrófago (1). De hecho, de acuerdo con los resultados mostrados en este trabajo, Chen y Johnson (3) también han observado un efecto estimulador de la prolactina sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos. En relación a las hormonas tiroideas, tanto T3 como T4, tienen propiedades inmunomoduladoras (28) y pueden regular la función del macrófago (4). Nuestros resultados demuestran que estas hormonas pueden también estimular la función fagocítica de los macrófagos. No obstante, la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento han indicado que los glucocorticoides son inmunosupresores, incluyendo la actividad de los monocitos y macrófagos. Sin embargo, la mayoría de los estudios recientes han mostrado que la inmunosupresión inducida por los glucocorticoides viene dada probablemente a través de una acción sobre la función de los linfocitos, y no directamente sobre las células fagocíticas (33). De hecho, la estimulación en la fagocitosis de los macrófagos inducida por concentraciones fisiológicas de corticosterona (250 ng/ml) mostrada en este trabajo está de acuerdo con la idea de que bajos niveles de glucocorticoides pueden estimular la inmunidad en lugar de deprimirla (46). Recientemente se ha indicado que incluso altas concentraciones terapéuticas de esteroides no producen cambios en la capacidad funcional del macrófago (33). Otros resultados también apoyan esta hipótesis: estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio detectaron un aumento en el proceso fagocítico de los macrófagos de cobaya paralelamente a un aumento en la concentración plasmática de corticosterona (33, 39). Además, la incubación durante 3 días de monocitos con glucocorticoides induce un aumento en la capacidad fagocítica de estas células (24).

Se ha establecido que la leucocitosis inducida por el ejercicio está mediada por las catecolaminas y los glucocorticoides (30), así como que la respuesta inmune específica llevada a cabo por los linfocitos también está mediada por la adrenalina, glucocorticoides, β -endorfinas y otras hormonas de estrés (20). Con respecto a la respuesta inmune inespecífica, se ha observado también que la adrenalina, noradrenalina, hormona del crecimiento, glucocorticoides y β -endorfinas modulan la estimulación inducida por el ejercicio sobre la actividad NK (36, 43).

Conclusión: A la vista de nuestros resultados podemos concluir que la actividad física extenuante produce una estimulación de los macrófagos para llevar a cabo la fagocitosis. Esta estimulación se encuentra mediada por la corticosterona, la prolactina y las hormonas tiroideas, si bien no se pueden descartar otros posibles mediadores neuroendocrinos. Por otro lado, de los resultados obtenidos en este trabajo también se podría concluir que una mayor susceptibilidad a la infección durante situación de estrés por el ejercicio físico intenso no es debida, a una menor capacidad de los macrófagos en llevar a cabo la fagocitosis, al menos en nuestro modelo de actividad física y el modelo animal estudiado.

5. BIBLIOGRAFÍA

- BARRIGA, C. y ORTEGA, E. Alteraciones de los leucocitos con elejercicio. *Biología Clínica Hematológica* 1992, 14: 161-167.
- BLALOCK, J.E.; HARBOUR-McMENAMIN, E. y SMITH, E.M. Peptide hormones by the neuroendocrine and immunologic systems *Journal of Immunology* 1985, 135: 858s-861s.

- BERNTON, E.W.; BRYANT, H.U. y HOLADAY. Prolactin and immune function. En ALDER, R.; FELTEN, D.L. y COHEN, N. *Psychoneuroimmunology*. San Diego, Academic Press, 1991, p. 403-428.
- CAREN, L.D. Effects of exercise on the human immune system. Does exercise influence susceptibility to infections?. *BioScience*, 1991, 41:410-414.
- CHEN, Y y JOHNSON, A.G. In vivo activation of macrophages by prolactin from young and aging mice. *International Journal Immunopharmacology*. 1993, 15: 39-45.
- COFFEY, R.G. y HADDEN, J.W. Neurotransmitters, hormones and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation. *Federation Proceedings*, 1985, 44:112-117.
- COSTA-ROSA, L.F.; CURY, Y. y CURI, R. Hormonal control of macrophage function and glutamine metabolism. *Biochemical Cell Biology* 1991, 69:309-312.
- CRIST, D., MACKINNON, L., THOMPSON, R., ATTERBOM, M. y EGAN, P. Physical exercise increases natural cellular-mediated tumor cytotoxicity in elderly women. *Gerontology*, 1989, 35:66-71.
- DE LA FUENTE, M. Changes in the macrophage function with aging. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1985, 81:935-938.
- DE LA FUENTE, M., MARTIN, I. y ORTEGA, E. Changes in the phagocytic function of peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. 1990, 13:189-198.
- ESKOLA, J., RUUSKANEN, O., SOPPI, E., VILJANEN, M.K., JARVINEN, M., TOIVONEN, H. y KOUVALAINEN, K. Effect of sport stress on lymphocyte transformation and antibody formation. *Clinical Experientia Immunology*. 1978, 3:339-345.
- FEHR, H.G., LÖTZERICH, H. y MICHNA, H. The influence of physical exercise on peritoneal macrophages functions: Histochemical and phagocytic studies. *International Journal Sports Medicine*. 1989, 9:77-81.
- FEHR, H.G.; LÖTZERICH, H. y MICHNA, H.: Human macrophages function and physical exercise: phagocytic and histochemical studies. *European Journal Applied Physiology*. 1989, 58:613-617.
- FERNANDEZ-PASTOR, J.M.; DIEGO, A.M. y FERNANDEZ-PASTOR, V.J. Hormonas y Ejercicio. En: *Fisiología de la actividad física y del deporte*. Gonzalez, J (Ed). Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. 1992. p 95-128.
- FERRY, A.; WEILL, B.; AMIRIDIS, I.; LAZIRY, R. y RIEU, M. Splenic immunomodulation with swimming-induced stress in rats. *Immunology Letter*. 1991, 29:261-264.
- FIATORONE, M., MORLEY, J., BLOOM, E., BENTON, D., MAKINODAN, T. y SOLOMON, G. Endogenous opioids and exercise-induced augmentation of natural killer cell activity. *Journal Laboratory Clinical Medicine*. 1988, 112:544-552.
- FITZGERALD, L: Exercise and the immune system. *Immunology Today*. 1988, 9:337-339.
- GABRIEL, H.; BRECHTEL, L.; URHAUSEN, A. y KINDERMANN, W. Recruitment and recirculation of leukocytes after an ultramarathon run: preferential homing of cells expressing high levels of the adhesion molecule LFA-1. *International Journal Sports Medicine*. 1994, 15:S148-S153.
- HOFFMAN-GOETZ, L.; KEIR, R.; THONER, R.; HOUSTON, M.E. y YOUNG, C. Chronic exercise stress in mice depresses splenic T lymphocyte mitogenesis in vitro. *Clinical Experientia Immunology*. 1986, 66: 551-557.
- HOFFMAN-GOETZ, L. y PEDERSEN, B.K. Exercise and the immune system: a model of stress response? *Immunology Today*. 1994, 15:382-387.
- ILBACK, N.G.; FRIMAN, G.; BEISEL, W.R.; JOHNSON, A.J. y BERENDT, R.F. Modifying effects of exercise on clinical course and biochemical response of the myocardium in influenza and tularemia in mice. *Infection Immunology*. 1984, 45 : 504-510.

- KELLEY, K.W. Growth hormone in immunobiology. En ALDER, R.; FELTEN, D.L. y COHEN, N. *Psychoneuroimmunology* San Diego, Academic Press, 1991, p337-402.
- KHANSARI, D.; MURGO, A. y FAITH, R. Effects of stress on the immune system. *Immunology Today*. 1990, 11:170-175.
- KURLANDER, R.J. The effects of corticosteroids on IgG, Fc receptor and complement receptor-mediated interaction of monocytes with red cells. *Clinical Immunology Immunopathology*. 1981, 20: 325.
- LARRABEE, R.C. Leucocytosis after violent exercise. *Journal of Medical Research*. 1902, 7:76-82.
- LEWICKI, R., TCHÓRZEWSKI, H.; DENYS, A.; KOWALSKA, M. y GOLINSKA, A. Effect of physical exercise on some parameters of immunity in conditioned sportsmen. *International Journal Sports Medicine*. 1987, 8: 309-314.
- LÖTZERICH, H.; FEHR, H.G. y APPELL, H.J. Potentiation of cytostatic but not cytolytic activity of murine macrophages after running stress. *International Journal Sports Medicine*. 1990, 11:61-65.
- LUO, M., FAURE, R., TONG, Y.A. y DUSSAULT, J.M. Immunocytochemical localization of the nuclear 3, 5, 3'-triiodothyronine receptor in the adult rat: liver, kidney, heart, lung and spleen. *Acta Endocrinology-Copenhagen*. 1989, 120: 451-458.
- MACKINNON, L.T. Exercise and Immunology: present and future Directions. En MACKINNON, L.T. *Exercise and Immunology*. Illions, Human Kinetics Publishers. 1992, p 85-90.
- McCARTHY, D.A. y DALE, M.M. The leucocytosis of exercise. *Sports Medicine*. 1988, 6:333-363.
- McGILLIS, J.P.; ORGANIST, M.L. y PAYAN, D.G. Substance P and Immunoregulation. *Federation Proceeding*. 1987, 46:196-199.
- MENDEL, D.B.; ORTI, E.; SMITH, L.I.; BODWELL, J. y MUNCK, A. Evidence for a glucocorticoid receptor cycle and nuclear dephosphorylation of the steroid-binding protein. En: *Molecular endocrinology and steroid hormone action*. SATO, G. y STEVENS, J.L. (Eds). New York: Alan R. Liss. 1989.
- MUNCK, A. y GUYRE, P.M. Glucocorticoids and immune function. En ALDER, R.; FELTEN, D.L. y COHEN, N. *Psychoneuroimmunology*. San Diego, Academic Press, 1991, p 447-474.
- NIEMAN, D.C.; HENSON, D.A.; GUSEWITCH, G., WARREN, B.J.; DOTSON, R.C.; BUTTERWORTH, D.E. y NEHLESEN-CANNARELLA, S.L. Physical activity and immune function in elderly women. *Medical Science Sport Exercise*. 1993, 25: 823-831.
- NIEMAN, D.C.; MILLER, A.R.; HENSON, D.A.; WARREN, B.J.; GUSEWITCH, G.; JOHNSON, R.L.; DAVIS, J.M.; BUTTERWORTH, D.E. y NEHLESEN-CANNARELLA, S.L. Effects of high-vs moderate intensity exercise on natural killer cell activity. *Medical Science Sport Exercise*. 1993, 25:1126-1134.
- NIEMAN, D.C. y NEHLESEN-CANNARELLA, S.L. The immune response to exercise. *Seminary Hematology*. 1994, 31:166-179.
- NORTHOFF, H.; WEINSTOCK, C. y BERG, A. The cytokine response to strenuous exercise. *International Journal Sports Medicine*. 1994, 15:S167-S171.
- ORTEGA, E.; COLLAZOS, M.A.; BARRIGA, C. y DE LA FUENTE, M. Effect of physical activity stress on the phagocytic process of peritoneal macrophages from old guinea pigs. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1992, 65:157-165.
- 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. *European Journal Applied Physiology*. 1992, 64:323-327.

- 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. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1993, 70:53-63.
- ORTEGA, E., GALAN, M., DE LA FUENTE, M. y BARRIGA, C. Influence of physical activity stress and age on the ADCC of lymphocytes from mice. *Archive of Gerontology and Geriatric*. 1993, 16:93-101.
- OVADIA, H. y ABRAMSKY, O. Dopamine receptors on isolated membranes of rat lymphocytes. *Journal of Neuroscience Research*. 1987, 18:70-74.
- PEDERSEN, B.K. y ULLUM, H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Medicine Science Sports Exercise*. 1994, 26:141-146.
- RODRIGUEZ, A.B.; BARRIGA, C. y DE LA FUENTE, M. Phagocytic function of blood neutrophils in sedentary young people after physical exercise. *International Journal Sports medicine*. 1991, 12:276-280.
- SEGURA, J.J.; GUERRERO, J.M.; GOBERNA, R. y CALVO, J.R. Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat peritoneal macrophages. *Regulation Peptides*. 1991, 33:133-143.
- SHARP, C. y PARRY-BILLINGS, M. Can exercise damage your health?. *New Science*. 1992, 33-37.
- SIMON, H.B. Exercise and human immune function. En: *Psychoneuroimmunology* (Second Edition), ADER, R.; FELTEN, D.L. y COHEN, N. (Eds). Academy Press, Inc. 1991. p 869-895.
- SMITH, J.A.; TELFORD, R.D.; MASON, I.B. y WIDERMANN, M.J. Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *International Journal Sports medicine*. 1990, 11:179-187.
- SUDAKOV, K.V. System approach to the problem of emotional stress. En USING, E.; KVETNASKY, R. y KOPIN, I.J. *Catecholamines and stress*. Elsevier North Holland. Recent Advances. 1985, p.579.
- SUDO, A. Accumulation of adrenaline in sympathetic nerve endings various organs of the rat exposed to swimming stress. *Journal Pharmacology*. 1985, 38:367-374.
- WEIGENT, D.A. y BLALOCK, J.E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: Common hormones and receptors. *Immunology Reviews*. 1987, 100:79-108.
- WOODS, J.A. y DAVIS, J.M. Exercise, monocyte/macrophage function and cancer. *Medicine Science Sports Exercise*. 1994, 26:147-156.

NORMAS DE PRESENTACIÓN PARA LA ADMISIÓN DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN¹

1. Los trabajos breves o sumarios de investigación que se presenten 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 numeradas 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 CNICD, acompañados de una fotografía del autor y un breve currículum relacionado con la obra (máximo 10 líneas).
4. **Soportes de presentación.** El trabajo deberá entregarse en papel DIN-A4, 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 Perfect (v. 5.1) 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 preceptores de ayudas del C.S.D. que presenten sumarios de investigación de acuerdo con los requisitos y condiciones establecidas para su publicación por el Consejo Superior de Deportes (a través del Centro Nacional de Investigación y 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 CNID.
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 Nacional de Investigación y 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 Nacional de Investigación y 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 interna ampliada, así como el modelo oficial de cesión de derechos y aceptación de las bases, al:

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS DEL DEPORTE
C/ del Greco s/n
28040 Madrid

Tel.: 91 589 05 27/28
Fax: 91 544 81 22

Colección:

INVESTIGACION EN 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 de trabajo 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
- 8.- Métodos de estudio de composición corporal en deportistas
- 9.- Valores sociales y deporte
- 10.- Educación Física y práctica docente
- 11.- El deporte en las universidades españolas
- 12.- Análisis biomecánico de las técnicas deportivas
- 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



Consejo
Superior de
Deportes

ISBN 847949090-X



9 788479 490904

EAN 9788479490904