

Tesis Doctoral

Impacto del ejercicio de Ultra Trail sobre el  
estado oxidativo del plasma y su relación  
con el daño muscular y la aparición de fatiga  
en una muestra de corredores amateurs

Carlos Guerrero Ramos



Dirigida por:

Dra. María Muriach Sauri

Dr. Eladio Collado Boira

Septiembre, 2024





Programa de Doctorado de Ciencias-UJI  
Escuela de Doctorado de la Universidad Jaume I

Impacto del ejercicio de Ultra Trail sobre el estado  
oxidativo del plasma y su relación con el daño  
muscular y la aparición de fatiga en una muestra de  
corredores amateurs

Memoria presentada por Carlos Guerrero Ramos para optar al  
grado de doctor por la Universitat Jaume I

Firmada por:

Carlos Guerrero Ramos

Dra. María Muriach Sauri

Dr. Eladio Collado Boira

Castelló de la Plana, septiembre de 2024





Licencia CC Reconocimiento -Compartir igual (BY-SA).

Carlos Guerrero Ramos agradece a todo el equipo multidisciplinar de FICUDEO de la Universitat Jaume I y a la Cátedra Villarreal Endavant, por el apoyo logístico prestado para realizar esta tesis.



## AGRADECIMIENTOS

## Agradecimientos

Después de muchos días en el laboratorio, con avances y retrocesos, dudas sobre si todo esto valía la pena, análisis de muestras en mi tiempo libre, fines de semana comprometidos con la recogida o análisis de muestras, por fin se ve la luz en el túnel. Todas las personas alrededor de mí han hecho posible la finalización de este trabajo.

A mis directores, Dr. Eladio Joaquín Collado Boira, quisiera darle las gracias a su impulso y su confianza en mí, ha hecho posible que fructifique esta tesis. Has sido el dinamizador necesario del grupo. Desde que lo conocí en el grado de enfermería en 2011, ha sido el referente para todos los estudiantes que hemos disfrutado de él. A la Doctora María Muriach Saurí que, gracias a ella, me reincorporó al mundo de la investigación universitaria, y que no estaba motivado por esa época y que me lo hizo más fácil descascarillar esa parte dormida, eres una gran persona, madre e investigadora. Como no olvidar a Dr. Aurelio Gómez Cadenas por intégrame en su laboratorio y participar y compartir desde experiencias personales de su grupo.

A los 49 participantes de la ultramaratón, al Hospital Vithas-Nisa Castelló, por los análisis de las muestras de bioquímica y hematología, al Servei d'esport de la UJI, en especial al Dr Ignacio Martínez (Nacho), gran elaborador del proyecto y coparticipa de Dr. Carlos Hernando, que con su organización hizo posible este trabajo y otros tantos, como este.

A los que ayudaron a extracción de las muestras de sangre, estudiantes de grado de enfermería (Rania, Raúl), Dra. Ana Folch, Dra. Amparo Bernat, a las estudiantes de Medicina de Trabajo Final de Grado, Clara, Blanca y Elena.

Al siguiente doctor en fisiología de los antioxidantes Ricard Romero, por realizar los ensayos de laboratorio, codo con codo, pasar horas interminables e intentar ver que nos está pasando, que fallamos y como lo remediamos y sin estar por el laboratorio dándonos el apoyo mutuo, igual no hubiéramos visto esa luz.

Al Dr. Pablo Baliño, que ha sido un compañero del laboratorio, que también ha ayudado en el laboratorio cuando todo se paraba y con sus anécdotas viajeras y de sus post doctorados amenizaba, estos problemas.

A la Dra. Cristina Abad, que horas de teléfono y trabajo del laboratorio para su tesis y la mía, hizo encaminar el laboratorio a buen término.

Como no me puedo olvidar de todo el equipo de agrícolas de la Dra. Rosa, Dr. Vicent, Marta, Dr. Tico, Dr Carlos, Dra. María y Dra. Sara, sin vuestros desayunos y trabajos en equipo y la dirección de Rosa no hubiera sido posible. ¡Gracias equipo, cuando me necesitéis estoy ahí!

Al laboratorio de Química Analítica de la UJI, por los conocimientos que adquirí en la determinación de componentes y su aplicación de esos conocimientos en esta tesis.

Porque de ahí con esa base se ha generado esta tesis. Gracias especialmente a Dr. Juanvi Sancho, Dr. José, Dra. Arantxa, Dra. Susana, Dr. Ramón, Dra. Elena, Dr. Robert, Dra. Tania, Dr. Oscar y Dra. María. ¡Gracias por los momentos maravillosos vividos y aprendidos!

A la futuras Doctoras Elena y Pilar, que deseo que sea breve el proyecto de tesis, porque ¡han iniciado una rueda que en el momento coja inercia, no se para y esto va de camino exponencial! ¡Mucho ánimo, compañeras! A la Dra Paula, por estar siempre ahí, que parece una guía para continuar viendo su gran Tesis.

Como no me puedo olvidar de Eva Vilar, que me cautivó en sus primeras prácticas de enfermería en el hospital, es meticulosa, constante y un gran referente en la vida, pese a su juventud. Su tesis será inminente, de eso estoy seguro. Quisiera agradecer los desayunos de las 9am, al Dr. Pablo Salas, Dra. Ana Folch,

Dra. Estefi, Dr. Conrado, Dra. Raquel, Dra. Amparo, y demás mencionados anteriormente por meterme en vuestro mundo universitario. Muchas gracias por tan grata acogida en vuestro grupo.

A todos los amigos que me soportan desde la niñez como Pedro, Maxi, Álvaro, José, Fefi, Tere, Puri, Mirian, Elena, Carlos, Saúl y Anna. Gracias por estar todos los fines familia y buenos momentos...

A las compañeras de trabajo, por aguantarme y disculpas por si alguna vez pensaba más en la tesis que en el trabajo. Gracias a: Carla, Tania, Chelo, María José, Paqui, Tamara, Alicia, Ally, Aurora, Paula, Lara, Magda, Yeray, Amparo, Gemma, Gema, Estela, Juanjo, Mar, Rosa, Cristina, Olga, Julia, Valeria, Silvias, Susana, Pili, Leticia, Leti, Macarena y Alba, el equipo de Gine y obstetricia. A Duli, por las correcciones de algunos textos ilegibles y haberles dado un gran avance en la transmisión de la información.

A mis hermanos, Javier y Susana, que indirectamente, también han sufrido esta tesis yendo a por muestras cuando yo estaba trabajando a Valencia y no pudiendo hacer planes, por estar en el laboratorio.

A mis padres, Toni y Tere, por no decirme nunca que estaba perdiendo el tiempo y siempre darme apoyo. Por secuestrar a mi padre para ir a por muestras y por no protestar.

Por ser un ejemplo de esfuerzo y perseverancia en la vida. Por el apoyo en todas las decisiones tomadas y apoyarme, aunque a veces me dijeras... ¿cómo va la investigación? Y te decía, ¡avanzando! Aquí esta resumido todas esas horas de trabajo y resumidas en este documento.

## RESUMEN



## RESUMEN

El estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiado en relación con los deportes de ultra resistencia. Aunque está claramente demostrado el aumento de especies reactivas de oxígeno y radicales libres tras estos ejercicios de resistencia extrema, aún es necesario profundizar en los efectos sobre las defensas antioxidantes y el daño oxidativo a las macromoléculas.

El objetivo del estudio fue dilucidar el impacto de una carrera de Ultra Trail en los marcadores plasmáticos de estrés oxidativo de 32 corredores y su recuperación post-carrera, con un enfoque especial sobre el sexo y la edad de los atletas. Para este propósito, se midió la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), así como el producto de la peroxidación lipídica malondialdehído (MDA) y el contenido de grupos carbonilo (CG) antes de la carrera, en la línea de meta y 24 y 48 horas después de la carrera.

Hemos observado un aumento en el daño oxidativo a lípidos y proteínas (MDA y CG) después de la carrera y 48 horas más tarde. Además, se otuvo un aumento en la actividad de la GR después de la carrera. No se mostraron cambios en la actividad de la GPx plasmática de los corredores a lo largo del estudio. Finalmente, observamos diferencias en el daño a macromoléculas relacionadas con el sexo y la edad, pero no se encontraron diferencias en las enzimas antioxidantes medidas.

Nuestros resultados sugieren que varios marcadores plasmáticos basales de estrés oxidativo podrían estar relacionados con la magnitud del daño muscular tras una carrera de ultra resistencia y también podrían afectar la evolución de la fuerza muscular.

**Palabras clave:** Ultra Trail; estrés oxidativo; antioxidantes; lesión muscular.



## ABSTRACT



## ABSTRACT

Oxidative stress has been widely studied in association to ultra-endurance sports. Although it is clearly demonstrated the increase in reactive oxygen species and free radicals after these extreme endurance exercises, the effects on the antioxidant defenses and the oxidative damage to macromolecules, remain to be fully clarified.

Therefore, the aim of this study was to elucidate the impact of an Ultra Trail race on the plasma markers of oxidative stress of 32 runners and their post-race recovery, with especial focus on sex and age effect. For this purpose, the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activity, as well as the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) and the carbonyl groups (CG) content were measured before the race, in the finish line and 24 and 48 h after the race.

We have reported an increase of the oxidative damage to lipids and proteins (MDA and CG) after the race and 48 h later. Moreover, there was an increase of the GR activity after the race. No changes were observed in runners' plasma GPx activity throughout the study. Finally, we have observed sex and age differences regarding damage to macromolecules, but no differences were found regarding the antioxidant enzymes measured.

Our results suggest that several basal plasma markers of oxidative stress might be related to the extent of muscle damage after an ultraendurance race and might affect the muscle strength evolution.

**Keywords:** Ultra Trail exercise; oxidative stress; antioxidants; muscle injury



## ÍNDICE DE CONTENIDO



<b>ÍNDICE TABLAS .....</b>	<b>29</b>
<b>ÍNDICE FIGURAS .....</b>	<b>33</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>37</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>45</b>
1.1 METABOLISMO OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES .....	45
1.1.1 Concepto de Radical Libre y Especie Reactiva .....	45
1.1.2 Generación de Radicales Libres y Especies Reactivas .....	46
1.1.3 Fuentes endógenas .....	47
1.1.4 Fuentes exógenas .....	49
1.2 PAPEL DUAL DE LAS ESPECIES REACTIVAS.....	50
1.3 CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	51
1.3.1 Daño oxidativo a biomoléculas .....	51
1.3.2 Daño oxidativo a lípidos .....	52
1.4 DEFENSA ANTIOXIDANTE .....	55
1.4.1 Concepto de antioxidante .....	55
1.4.2 El sistema glutatión.....	55
1.4.3 Otros antioxidantes naturales.....	58
1.4.4. Dieta y estado oxidativo .....	63

1.5 SALUD Y DEPORTE .....	63
1.5.1 Antecedentes.....	63
1.5.2 El Proyecto CRS. Maratón Valencia 2016. ....	65
1.5.3 Proyecto PTS Woman. Penyagolosa Ultra Trail 2019.....	66
1.6 ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	68
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>72</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
3.1. PARTICIPANTES.....	77
3.1.1 Comité ético.....	77
3.2. VARIABLES DE ESTUDIO .....	77
3.2.1 Variables sociodemográficas, de entrenamiento y rendimiento en carrera ...	77
3.2.2 Variables de estrés oxidativo .....	78
3.3. INSTRUMENTACIÓN NECESARIA PARA LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS: .....	78
3.4 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	79
3.5 PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN Y DAÑO MUSCULAR .....	80
3.6 MARCADORES DE ESTADO OXIDATIVO:.....	80
3.6.1 Determinación de actividad glutatión peroxidasa GPx.....	80
3.6.2 Determinación de la actividad GR.....	82

3.6.3 Determinación de la concentración de MDA .....	83
3.6.3 Determinación de grupos carbonilo en proteínas .....	85
3.7. FUERZA MUSCULAR. EVALUACIÓN DE LA FUERZA SQUAT JUMP (SJ) Y HANDGRIP (HG) .....	86
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	88
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>93</b>
4.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA DE ESTUDIO.....	93
4.1.1 Características de los sujetos, rendimiento en carrera y hábitos de entrenamiento. Por sexo.....	93
4.1.2 Características de los sujetos, rendimiento en carrera y hábitos de entrenamiento. Por grupos de edad.....	94
4.2 EVOLUTIVO VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS PRE-POST CARRERA.....	96
4.2.1 Evolutivo Variables Antropométricas Pre-Post Carrera por Sexo.....	96
4.2.2 Evolutivo Variables Antropométricas Pre-Post Carrera por Grupos de Edad.....	98
4.3 VARIABLES EVOLUTIVAS DE FUERZA, DAÑO MUSCULAR, INFLAMACIÓN Y RECUPERACIÓN POST-CARRERA .....	99
4.3.1 Variables de fuerza, daño muscular, inflamación y recuperación post-carrera por sexo.....	102
4.3.2 Variables de fuerza, daño muscular, inflamación y recuperación Post-carrera por grupos de edad .....	108
4.4 VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	113

4.4.1 Evolutivo de las variables de estrés oxidativo por sexo .....	118
4.4.2 Variables de carrera estrés oxidativo por grupos de edad.....	123
4.5 CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES DE ESTRES OXIDATIVO, FUERZA, DAÑO MUSCULAR Y RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA.....	128
4.6 ANÁLISIS DE REGRESIÓN MULTIPLE.....	128
<b>5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>133</b>
5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS, RENDIMIENTO EN CARRERA Y HÁBITOS DE ENTRENAMIENTO .....	133
5.2. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS.....	135
5.3 VARIABLES DE FUERZA, DAÑO MUSCULAR, INFLAMACIÓN Y RECUPERACIÓN POST-CARRERA .....	136
5.3.1. Variables de fuerza y fatiga muscular .....	136
5.3.2. Daño muscular inflamación y recuperación postcarrera.....	138
5.4 VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	140
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>153</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>177</b>
ANEXO N°1. APROBACIÓN COMITÉ ÉTICO .....	179

ANEXO N°2. AUTORIZACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	183
ANEXO N° 3. HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	187
ANEXO N° 4. PUBLICACIÓN DEL ESTUDIO .....	191



## ÍNDICE TABLAS



## Índice Tablas

Tabla 1 Características de los sujetos, rendimiento de carrera y hábitos de entrenamiento por sexo. ....	93
Tabla 2 Características de los sujetos, rendimiento en carrera y hábitos de entrenamiento por grupos etarios.....	95
Tabla 3 Evolutivo variables antropométricas pre-post carrera por sexo. ....	97
Tabla 4 Evolutivo variables antropométricas pre-post carrera por grupos de edad... 98	
Tabla 5 Variables de HG y SJ de ambos sexos, en precarrera y en la meta. Enzimas marcadores de la inflamación CK, LDH y PCR.....	99
Tabla 6 Variables de fuerza, daño muscular, inflamación y recuperación post-carrera por sexo.....	103
Tabla 7 Variables de fuerza, daño muscular, inflamación y recuperación POSTCARRERA por grupos de edad. ....	108
Tabla 8 Variables de estrés oxidativo. ....	113
Tabla 9 Variables de estrés oxidativo por sexo. ....	118
Tabla 10 Variables de carrera de estrés oxidativo por grupos de edad.....	123
Tabla 11 Correlación entre los marcadores de estrés oxidativo y la fuerza de producción del músculo esquelético, daño muscular y respuesta inflamatoria sistémica	128
Tabla 12 Modelos de regresión lineal.....	129



## ÍNDICE FIGURAS



## Índice Figuras

Figura 1. Especies reactivas más relevantes .....	46
Figura 2 Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Generación de ROS durante la reducción monovalente del oxígeno. Imagen original del autor. ....	47
Figura 3 Esquema de los mecanismos implicados en la lipoperoxidación.....	53
Figura 4 Estructura química del MDA. Imagen original del autor.....	54
Figura 5. Síntesis de GSH. Imagen original del autor. ....	56
Figura 6. Representación del sistema glutatión. (Meister A. 1998). ....	58
Figura 7. Estructura química del ácido ascórbico. Imagen original del autor. ....	60
Figura 8 Mecanismos de actividad antioxidante de carotenoides.....	62
Figura 9. Hang Grip utilizado. Imagen original del autor. ....	87
Figura 10 Evolución temporal de CK (U/L) para ambos.....	100
Figura 11 Evolución temporal para ambos sexos .....	101
Figura 12 Evolución temporal de PCR para ambos sexos.....	102
Figura 13 diferencias de variables HG y SJ por sexo .....	104
Figura 14 Evolución temporal de CK.....	105
Figura 15 Evolución temporal de LDH .....	106
Figura 16 Evolución temporal de PC por sexos .....	107
Figura 17 Representación de HG y SJ por edades.....	109
Figura 18 Evolución de CK por edades .....	110

Figura 19 Evolución de LDH por edades .....	111
Figura 20 Evolución de PCR por grupos de edades .....	112
Figura 21 Evolución de GPx.....	114
Figura 22 evolución de la actividad GR .....	115
Figura 23 Evolución de MDA .....	116
Figura 24 Evolución en el tiempo de los GC.....	117
Figura 25 Evolución de la actividad de GPx por sexo.....	119
Figura 26 Evolución de la actividad de GR por sexo .....	120
Figura 27 Evolución de la concentración de MDA por sexo.....	121
Figura 28 Evolución de la concentración de GC .....	122
Figura 29 Evolución de la actividad GPx por grupos de edades .....	124
Figura 30 Evolución de la actividad GR por grupos de edades.....	125
Figura 31 Evolución de MDA por grupos de edades.....	126
Figura 32 Evolucion de la concentración de GC por grupos de edades .....	127

## ABREVIATURAS



## Abreviaturas

$\alpha$	Alfa
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGEs	Productos avanzados de glicación
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
$\beta$	Beta
BER	Reparación de escisión de base
BR	Inversión de base
Ca	Calcio
CAT	Capacidad antioxidante Total
°C	Grados centígrados
C	Control
CA	Control con arándanos
CGA	Ácido clorogénico
CGC	Contenido en grupos carbonilo
cm	Centímetros
CSA	Control sin arándanos
Cl	Cloro
ClH	Acido Clorhídrico
Cu	Cobre
CuZn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de Cobre y Zinc
Da	Dalton
DAD	Detector diodos
D.S.	Desviación standard
DHA	Ácido docosahexaenico

dL      decilitro  
DNFH 2,4-dinitrofenilhidrazina  
DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
DT-diaforasa NADPH-quinona oxidoreductasa  
e<sup>-</sup>      electrón  
EC-SOD      Superóxido dismutasa extracelular  
EDTA Ácido etilendiamino tetracético  
EFSA Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria  
EFV Factor de crecimiento endotelio vascular  
EGF Factor de crecimiento epidérmico  
eNOS Óxido nítrico sintasa endotelial  
EPA Acido eicosapentanóico  
FAD Flavín adenín dinucleótido  
FAP Factor activador de plaquetas  
Fe Hierro  
FeCl<sub>3</sub> Cloruro férrico  
FeSO<sub>4</sub> Sulfato ferroso  
FEV1 Volumen expiratorio máximo en 1 minuto  
FVC Capacidad vital forzada  
FGF Factor estimulante de fibroblastos  
FLD Detector de fluorescencia  
FRAP Capacidad antioxidante mediante reducción férrica (Ferric reduction antioxidant power)  
g      gramo  
GCSF Factor estimulador de granulocitos  
GPx Glutación peroxidasa  
GSH Glutación reducido  
GSSG Glutación oxidado  
H<sub>2</sub>O Agua  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrógeno  
HC Hidratos de carbono

HG Hand Grip en Kg  
HGF Factor estimulante de hepatocitos  
HPLC Cromatografía líquida de alta resolución.  
Ig Inmunoglobulina  
IGF-1 Factor de crecimiento insulínico tipo I  
IL Interleukina  
IMC Índice de masa corporal  
iNOS Óxido nítrico sintasa inducible  
IOM Instituto de Medicina de Estados Unidos  
k Kappa  
K Potasio  
Kcal Kilocaloria  
kDa kiloDalton  
L litro/leche  
LDH Lactato deshidrogenasa  
LDL Lipoproteínas de baja densidad  
M Mastitis  
MA Mastitis con arándanos  
MDA Malondialdehído  
MDH Malato deshidrogenasa  
Mg Magnesio  
mg miligramos  
MIP presión inspiratoria máxima  
mL mililitros  
Mn Manganeseo  
Mn-SOD Superóxido dismutasa dependiente de manganeseo  
MSA Mastitis sin arándanos  
N Normal  
Na Sodio  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Carbonato sódico  
NAD<sup>+</sup> Nicotinamida adenina dinucleótido

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NER	Reparación de escisión de nucleótido
NF-kB	Factor de transcripción nuclear kappa de células B activadas
nm	nanómetros
nMol	nanomoles
NMDA	N-metil D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO•	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido dinitrógeno
NOS	Especies reactivas del nitrógeno
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singlete
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido
OH•	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
p	significación estadística
PACs	Proantocianidinas
PEF	Flujo espiratorio máximo
PGE	Prostaglandinas
pO <sub>2</sub>	Presión parcial de Oxígeno
Q <sub>10</sub>	Complejo quinona-semiquinona-ubiquinol
QH <sub>2</sub>	Ubiquinol
rpm	Revoluciones por minuto
RDI/RDA	Ingesta Dietética Recomendadas (Recommended Dietary Allowances)
REDOX	Oxido-reducción
RLs	Radicales libres

RN	Recién nacido
RO•	Radical alcoxilo
ROH	Radical hidroxilo
ROO•	Peroxilo
ROOH	Radical alquilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno, especies oxigénicas reactivas
s	Segundos
S	Azufre
Se	Selenio
Se-GPx	Glutación peroxidasa selenio dependiente
SJ	Squad Jump en cm
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidad antioxidante medida en equivalentes de Trolox
TLR4	Proteína que al activarse conduce a la vía de señalización NF-KB
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPTZ	2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UI	UNIDADES INTERNACIONALES
UV	Ultravioleta
vit	vitamina
VO <sub>2</sub> max.	Volumen máximo de oxígeno
v	volumen
Zn	Cinc
µg	microgramo
µL	microlitro
µMol	micromoles
X	media estadística



## 1 INTRODUCCIÓN



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 METABOLISMO OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

La presencia de oxígeno en la atmósfera es indispensable para el desarrollo y supervivencia de las especies aerobias del planeta, incluido el hombre. El metabolismo oxidativo utiliza el O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones, posee una alta eficiencia energética y representa la base de procesos fisiológicos indispensables como la respiración celular. Sin embargo, debido a sus características paramagnéticas, genera también sustancias potencialmente tóxicas y muy reactivas capaces de inducir daño oxidativo. Así, numerosos estudios han puesto de manifiesto que estas sustancias pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, contribuyendo al envejecimiento celular y al desarrollo o evolución de numerosas enfermedades [1–7].

Por lo tanto, la vida aerobia se caracteriza por una formación continua de moléculas prooxidantes equilibrada por la desaparición de las mismas gracias a la acción de agentes antioxidantes. En este sentido, se define el estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros [8].

### 1.1.1 Concepto de Radical Libre y Especie Reactiva

Se denominan radicales libres (RLs) a aquellas moléculas que contienen un electrón desapareado en su orbital más externo, haciéndolas muy inestables y reactivas. Esta situación de inestabilidad hace que dichas moléculas tiendan a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas con el objetivo de completar este orbital. Sin embargo, este proceso desestabiliza la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas, pudiendo generar reacciones en cadena [8,9].

La mayoría de los RLs proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno, por lo que muchos autores los denominan también “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Sin embargo, los RLs y ROS, no son exactamente sinónimos dado que, algunas ROS no son radicales (como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso). Otra denominación ampliamente utilizada que resultaría aplicable a todos ellos, es la de “oxidantes”.

Es importante destacar, además, que el metabolismo del óxido nítrico también genera especies reactivas de nitrógeno (RNS). Así, el óxido nítrico al presentar un electrón desapareado en su orbital más externo es por sí mismo un radical, y como en su metabolismo tienen lugar reacciones con el oxígeno molecular o ROS, entre otras moléculas, se generan también RNS. Entre ellas podemos citar el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el trióxido dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) o los nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Por lo tanto, la producción excesiva o desregulada del óxido nítrico y las especies reactivas del nitrógeno que de él derivan [4] también puede dar lugar a una situación de estrés nitrosativo, equivalente a la descrita anteriormente para el oxígeno. Dicha situación también se asocia a procesos inflamatorios, neurotoxicidad, isquemias relacionadas con numerosas patologías. [4–7].

A continuación, en la Figura 1, se recogen las principales NOS y ROS, clasificados en radicales y no radicales [9,10] (Tabla 1).

<b>Radicales</b>	<b>ROS</b>	Anión superóxido	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
		Radical Hidroxilo	OH <sup>•</sup>
		Radical alcoxilo	RO <sup>•</sup>
		Peroxilo	ROO <sup>•</sup>
	<b>NOS</b>	Oxido Nítrico	NO <sup>•</sup>
<b>No Radicales</b>	<b>ROS</b>	Peróxido de Hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Oxígeno singlete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
	<b>NOS</b>	Peroxinitrito	ONOO <sup>-</sup>

FIGURA 1. ESPECIES REACTIVAS MÁS RELEVANTES

Figura 1. Especies reactivas más relevantes (Halliwell B, 1996)[9,10]

### 1.1.2 Generación de Radicales Libres y Especies Reactivas

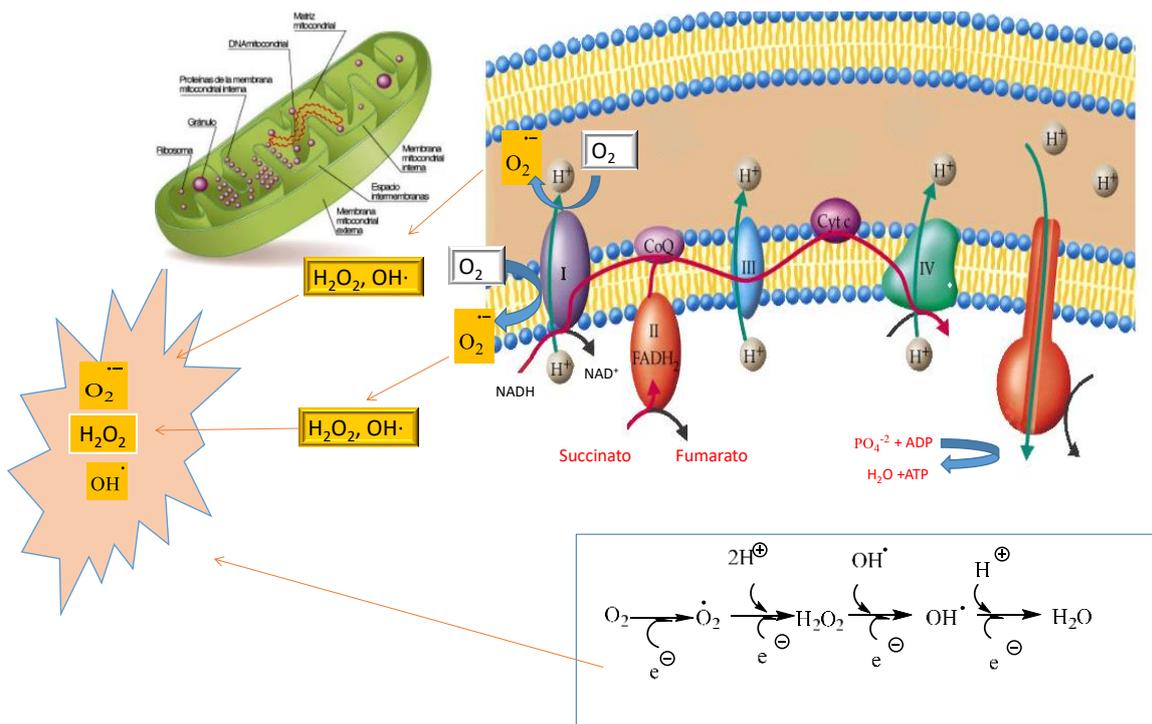
Los RL y ROS pueden proceder bien de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones externas (fuentes exógenas), tal y como se recoge a continuación:

### 1.1.3 Fuentes endógenas

Como fuentes endógenas de generación de RL existen:

a) cadena de transporte electrónico mitocondrial

Es la principal fuente de ROS intracelular [11]. Se transfieren electrones desde un donador inicial, creando un gradiente electroquímico que se utiliza para la síntesis de ATP. Dicho gradiente electroquímico se genera mediante el flujo de electrones entre diversos compuestos de esta cadena siendo el aceptor de electrones final el  $O_2$ . Así, el 95 % del oxígeno que respiramos es reducido a  $H_2O$ , mediante este mecanismo en el que participan cuatro centros redox [12]. Sin embargo, del 3-5% del oxígeno que respiramos puede dar lugar a la formación de ROS, como el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), como consecuencia de la reducción monovalente de la molécula de oxígeno.



**FIGURA 2 ESQUEMA DE LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL. GENERACIÓN DE ROS DURANTE LA REDUCCIÓN MONOVALENTE DEL OXÍGENO. IMAGEN ORIGINAL DEL AUTOR.**

b) sistema microsomal hepático.

Este sistema (Figura 1) está constituido por la flavoproteína NADPH-citocromo P-450 reductasa, junto con el citocromo microsómico, el P-450. Aunque en el hombre, los P-450s se encuentran localizados ampliamente por todo el organismo, en el hígado es donde se da la mayor expresión de estas enzimas. Este citocromo cataliza reacciones de oxidación dependientes de NADPH utilizando oxígeno molecular con el objeto de eliminar fármacos y tóxicos. Sin embargo, en este proceso se genera ion superóxido [13].

c) elevada actividad de la enzima xantina oxidasa.

La xantina deshidrogenasa es la enzima encargada en condiciones normales de oxidar la hipoxantina a xantina y ésta a ácido úrico, sin producir ROS, al actuar el  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones [14]. Sin embargo, en condiciones de hipoxia es la xantina oxidasa la que cataliza esta reacción, utilizando el oxígeno como aceptor de electrones. En estas condiciones sí se induce la formación del anión superóxido y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como productos de su acción catalítica [15].

d) activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios.

El ácido araquidónico se encuentra formando parte de la estructura de los fosfolípidos de membrana. Aunque su concentración libre es muy baja, determinados estados fisiológicos o patológicos pueden estimular su liberación. Una vez liberado, parte del ácido araquidónico es metabolizado dando lugar a productos oxigenados por acción de diferentes sistemas enzimáticos como la ciclooxigenasa o varias lipooxigenasas o familias de citocromo P-450. Algunos de estos mecanismos dan lugar a la formación anión superóxido y radicales hidroxilos [15,16].

e) activación de la enzima óxido nítrico sintetasa.

Esta enzima se puede presentar tres isoformas:

- nNOS o NOS I, NOS neuronal.
- iNOS o NOS II, NOS inducible.

- eNOS o NOS III, NOS endotelial.

Todas ellas inducen la formación del óxido nítrico, una de las especies reactivas más relevantes en la regulación biológica [17–19].

- f) activación de células fagocitarias.

Los fagocitos activados son una fuente importante de RLs al consumir una gran cantidad de oxígeno que destinan a la generación de Anión superóxido  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ , que utilizan como mecanismo microbicida [20]. De igual manera, a través de la enzima óxido nítrico sintasa, generan óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), como mecanismo de defensa. La combinación del ión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) con el  $NO^{\bullet}$  da lugar a peroxinitrito, capaz asimismo de inducir peroxidación lipídica y producir lisis celular [21].

#### 1.1.4 Fuentes exógenas

Entre las principales fuentes exógenas de ROS podemos citar las siguientes:

- a) ambientales.

Entre los factores ambientales se encuentran el tabaco, las radiaciones UV, rayos X, rayos gamma, el ozono, los pesticidas, los contaminantes aéreos fotoquímicos, algunos iones metálicos o los hidrocarburos aromáticos. Estos agentes pueden poseer RLs, o bien convertirse en ROS a través de las reacciones del metabolismo celular. Estos agentes pueden causar mutaciones genéticas, cáncer y muerte celular [2,22].

- B) nutricionales.

La dieta también es una fuente de ROS, al incluir contaminantes, aditivos, e incluso algunos nutrientes cuyo consumo excesivo puede generar un incremento de ROS. Algunas sales de metales con el hierro o el cobre pueden favorecer la generación de radicales libres, convirtiéndose en factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares o cáncer, cuando se absorben en grandes cantidades. El exceso de ácidos grasos polinsaturados o de glucosa también pueden generar RLs al ser susceptibles de ser oxidadas [23,24].

c) farmacológicas

Los xenobióticos, incluyendo los fármacos, son una fuente exógena de generación de ROS celular en sus procesos de biotransformación enzimática, ya sea por metabolización directa a RLs o por activación de fuentes endógenas de ROS [25,26]. Ejemplos de estos compuestos serían las moléculas con átomos de cloro, compuestos aromáticos como las quinonas (presentes en por ejemplo en pesticidas), iones metálicos, ésteres, barbitúricos o algunos antibióticos [26–28].

## 1.2 Papel dual de las especies reactivas

Los RLs son necesarios para el buen funcionamiento celular habiéndose demostrado, por ejemplo, su función como segundos mensajeros o estimulando y generando mediadores para la activación de las células en el crecimiento si se encuentran en bajas concentraciones [29]. Sin embargo, se producen reacciones de oxidación indeseadas al acumularse. Es por ello también, que los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes que permitan su eliminación o la transformación en moléculas estables [8,30–32]. Por lo tanto, no resulta fácil catalogar a las ROS como moléculas beneficiosas o dañinas. Según Jackson y colaboradores en 2002 [33], su papel va a depender del proceso celular que se analice. Así por ejemplo en los procesos de necrosis a consecuencia de los mecanismos de isquemia-reperfusión, las ROS no resultarían beneficiosas [28]. Mientras que, por otro lado, en procesos de apoptosis pueden ser vistas, de manera ambivalente, como dañinas o también como positivas para el organismo [33].

En los procesos de inflamación, el papel de las ROS también puede ser mixto. Así, en el ámbito proinflamatorio proporcionan una mejora en la respuesta inmune consiguiente a la infección; sin embargo, en trastornos de la respuesta inmune, como la artritis reumatoide, esta respuesta es inapropiada y debe ser suprimida [28].

Los RLs también pueden relacionarse con procesos patológicos como la hipertensión [34,35], la disfunción cardiovascular, la diabetes [36], el SIDA [37,38], la epilepsia [39–41], etc. En estas situaciones los RLs pueden acumularse y alterar mecanismos celulares generando daño a macromoléculas vitales como el DNA, lípidos o proteínas.

## 1.3 Concepto de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras [41]. Así, este estrés oxidativo se podría producir como consecuencia de un descenso de las defensas antioxidantes, por incremento de las especies prooxidantes, o bien por ambas.

En cualquier caso, dicho desequilibrio puede conllevar como resultado un daño oxidativo que se puede intentar paliar incrementado la función de las defensas antioxidantes. Esta sobreactivación de las defensas antioxidantes se puede potenciar endógenamente como mecanismo compensatorio intrínseco o bien exógenamente mediante la administración de antioxidantes en forma de suplementos dietéticos [42].

### 1.3.1 Daño oxidativo a biomoléculas

Los RLs tienen la capacidad de oxidar cualquier tipo de biomolécula como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y glúcidos [43]. En nuestro estudio se ha llevado a cabo la determinación de marcadores de daño oxidativo a proteínas y lípidos.

#### 1.3.1.1 Daño oxidativo a proteínas.

Los RLs son capaces de oxidar a todos los aminoácidos por sus terminaciones carbonilo y aminas presentes en las proteínas y estos grupos forman uniones proteína-proteína (amidas) o fragmentar el esqueleto de la proteína [44]. Sobre estos grupos carbonilo, se puede dar dicha oxidación, originando un cambio conformacional de la proteína, modificando o perdiendo la función biológica. La susceptibilidad de una proteína al ataque de los radicales libres puede depender tanto de su composición de aminoácidos, como su estructura terciaria y cuaternaria. Debe destacarse, en este sentido, que la metionina y la cisteína son especialmente sensibles a la oxidación por su composición de los grupos tioles en los radicales a casi todas las formas de ROS [45].

Asimismo, existen procesos oxidativos reversibles e irreversibles. Entre las oxidaciones reversibles se encontraría por ejemplo la oxidación de la metionina a metionina sulfóxido y su reducción enzimática de nuevo a metionina. Entre las irreversibles encontramos la

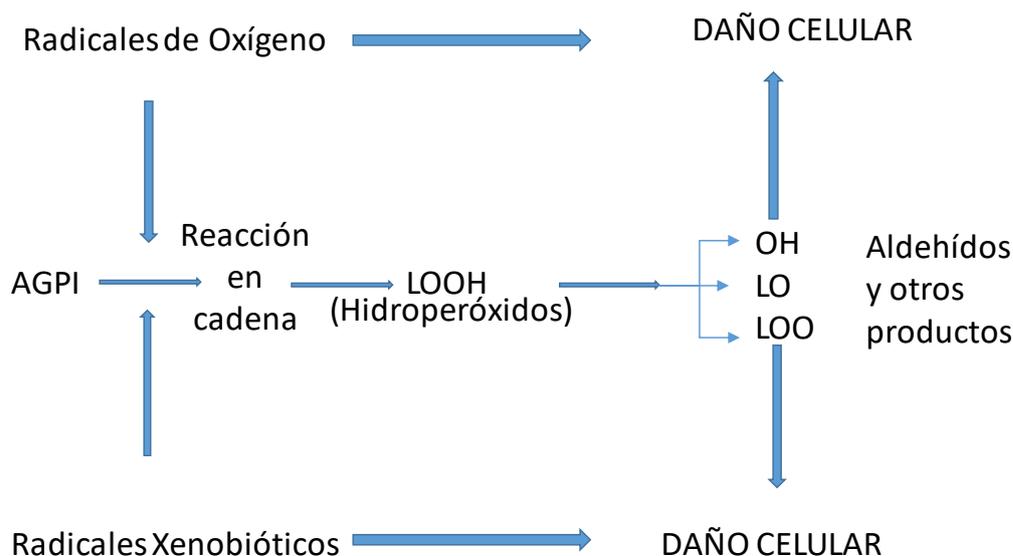
oxidación de la histidina y el triptófano, en la que tiene lugar una ruptura del anillo imidazólico de dichos aminoácidos [46–48].

Los grupos carbonilo se introducen en las proteínas por la reacción de los aldehídos que se producen durante la peroxidación lipídica, o con derivados del carbonilo reactivos que se generan durante la reacción de reducción de azúcares. Entre las proteínas susceptibles a estos procesos oxidativos se encuentran la LDL, generando un factor de riesgo para procesos como la aterosclerosis. Existen estudios por otro lado, que demuestran que antioxidantes presentes en fuentes vegetales como las leguminosas, podrían ayudar a prevenir estos procesos de oxidación proteica [48][49].

### 1.3.2 Daño oxidativo a lípidos

La peroxidación lipídica es un proceso oxígeno dependiente que consiste en el deterioro oxidativo de las grasas, principalmente de los ácidos grasos poliinsaturados. Tiene lugar en muchos casos, cuando el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) se genera en la proximidad de las membranas celulares, oxidando a los ácidos grasos de los fosfolípidos, en especial los poliinsaturados como el ácido docohexanoico o el araquidónico.

Se trata de una reacción en cadena en la que un único  $\bullet\text{OH}$  es capaz de generar una gran cantidad de lípidos hidroperoxidados, que al ser compuestos muy inestables se descomponen dando lugar a nuevas especies reactivas. Así, se inician sucesivas cascadas de peroxidación, cuya propagación indefinida es la que genera y amplifica el daño al inducir una pérdida de fluidez en las membranas e incluso la muerte celular tal y como se muestra en la Figura 5, adaptada desde Janero 1990 [50].



**FIGURA 3 ESQUEMA DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA LIPOPEROXIDACIÓN.**

Entre los principales productos de la peroxidación lipídica, se encuentran aldehídos como el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi alquenoales, como el 4-hidroxi nonenal y el 4-hidroxi hexenal [51]. En este trabajo se ha escogido el estudio del MDA como marcador de peroxidación lipídica.

#### 1.3.2.1. MALONDIALDEHÍDO (MDA)

El MDA es una molécula que dado su bajo peso molecular ( $PM = 72,07$ ) es muy volátil, con un  $pK_a = 4.46$  y un grupo 1,3-dicarbonilo siendo moderadamente ácido (Figura 3). Tanto en la fase gaseosa como en solución, se encuentra completamente enolizado, manteniendo un equilibrio entre dos formas asimétricas.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, es el resultado de la degradación oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del docosahexanoico y araquidónico. Pryor y colaboradores describieron las rutas para su formación [52,53], que consisten siempre en una primera ciclación del ácido graso poliinsaturado originario, para finalmente, tras la obtención de varios intermediarios, dar entre otros productos de degradación, el MDA. Al ser un producto final común en los procesos de peroxidación lipídica independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado en origen, el MDA está considerado como un buen marcador de este proceso [54].

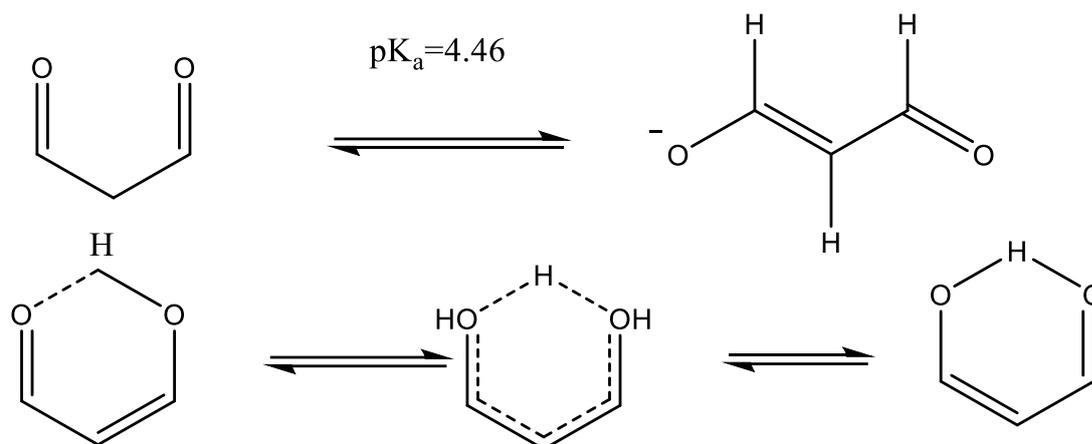


FIGURA 4 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL MDA. IMAGEN ORIGINAL DEL AUTOR.

Dada la importancia de la determinación del MDA como marcador de peroxidación lipídica en el estudio del estado oxidativo de individuos sujetos a situaciones de estrés oxidativo, resulta relevante la elección de una técnica con sensibilidad y reproducibilidad adecuadas. En general se utilizan técnicas que se basan en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico, sin embargo, ya en 1991, Esterbauer y colaboradores demostraron [57] que el nivel de remanentes de la peroxidación de lípidos en el plasma de sujetos sanos puede variar según la técnica empleada desde 0 (indetectable) a 47,2 nmol/ml. El problema estriba principalmente en que el nivel detectado por algunas técnicas proviene, además de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, de la degradación de otros productos (como azúcares, aminoácidos, aldehídos, ácidos orgánicos...)[50,54]. Por ello, la literatura señala a la determinación de MDA mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como una de las técnicas más adecuadas para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica.

## 1.4 DEFENSA ANTIOXIDANTE

### 1.4.1 Concepto de antioxidante

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la generación de ROS es inevitable en los seres vivos, desempeñando incluso funciones fisiológicas indispensables. Sin embargo, es necesario encontrar un equilibrio de forma que no lleguen a ser dañinos.

Se considera un antioxidante “cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato” [55]. Hay que tener en cuenta además que, casi cualquier molécula presente en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA El término es susceptible de ser oxidada. Con esta premisa, la definición de antioxidante ha evolucionado posteriormente a “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo sufrido por una molécula diana” [56].

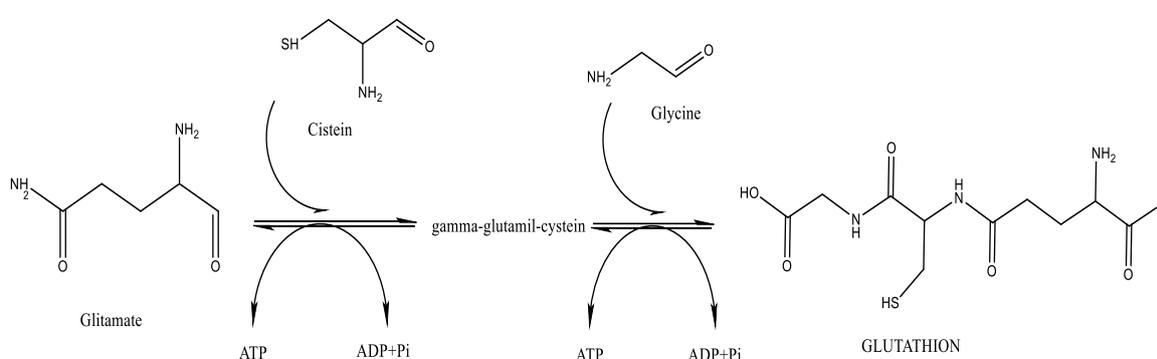
Teniendo en cuenta que, la desintoxicación del exceso de ROS es indispensable para la vida aerobia, ha sido necesario el desarrollo de un importante sistema defensivo antioxidante que incluye compuestos recolectores y agentes neutralizadores no enzimáticos (vitaminas C y E, glutathione, etc.), enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, capaces de inactivar directamente ROS (catalasa, superóxido dismutasa, glutathione peroxidasa, etc.), y por las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glutathione S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.) [57].

### 1.4.2 El sistema glutatión

El glutatión (GSH) descubierto por Hopkins en 1921, es un tripéptido formado por los aminoácidos; ácido glutámico, cisteína y glicina, con dos características estructurales (un enlace  $\gamma$ -glutamilo y un grupo tiol libre) que lo convierten en el antioxidante endógeno de referencia por su función de protección frente al oxígeno [58]. Así, por un lado, la terminación tiólica de la cisteína le confiere gran reactividad para intervenir en reacciones redox, intercambiando electrones a través del azufre de la cisteína. Por otro, el enlace  $\gamma$ -

glutamilo le protege de la acción de las peptidasas. Hay que tener en cuenta, además, que es el tiol no proteico más abundante en prácticamente todas las especies animales [59]. Se sintetiza principalmente en el hígado, pero también es transportado por la circulación sanguínea hasta el resto tejidos.

La síntesis del GSH se produce en dos etapas. En la primera etapa se genera g-glutamilcisteína a partir del ácido glutámico y la cisteína, a través de la reacción catalizada por la g-glutamilcisteína sintetasa. Posteriormente, en una segunda etapa, la enzima glutatión sintetasa cataliza la reacción en la que la g-glutamilcisteína se une con la glicina dando lugar al tripéptido final [60].



**FIGURA 5. SÍNTESIS DE GSH. IMAGEN ORIGINAL DEL AUTOR.**

Se denomina sistema glutatión, al conjunto formado por el glutatión y las enzimas relacionadas con su metabolismo (Figura.5), que son además responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas [61]. El glutatión se puede encontrar como glutatión reducido (GSH), como glutatión oxidado (GSSG) (al estar compuesto por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas), o en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. Sin embargo, se encuentra principalmente en las células en su forma reducida. Se considera estado del glutatión al equilibrio entre las distintas formas en las que se puede presentar [62]. Sin embargo, el

término estado no implica unos valores constantes para el glutatión, sino que estos quedan supeditados a las alteraciones del sistema.

Las enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión son las siguientes:

-Actividad peroxidasa representada por las enzimas:

1. Glutatión peroxidasa (GPx): se trata de una enzima que contiene selenio, cuya principal función es reducir el  $H_2O_2$  a agua y otros hidroperóxidos orgánicos a etanol, utilizando como donador de electrones el glutatión reducido. Es la forma más común de actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos, protegiendo por tanto a las membranas celulares del daño oxidativo [63]. Se ha descrito que los animales con deficiencias en selenio, presentan un descenso de la actividad de esta enzima [64]. Sin embargo, también se sabe que existen dos tipos de GPx, una de las cuales es independiente del selenio (GPx, EC 2.5.1.18) [65]. Hay que destacar además que, en humanos, se han identificado ocho isoformas diferentes de GPx (GPx1-GPx8) [66,67]. Aunque, la mayor parte de la actividad GPx se encuentra en el citosol y por tanto es una enzima relevante a nivel intracelular [68], es importante destacar que de las 8 isoformas de la enzima, dos de ellas se encuentran en compartimentos extracelulares y por tanto se pueden determinar en fluidos como el plasma o la leche [69].

2. Glutation transferasa con acción peroxidasa: Se ha descrito que en condiciones de deficiencia de selenio en ratas, la GPx seleno dependiente disminuye su actividad, siendo ésta compensada con un incremento de la actividad glutatión transferasa [70]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunas isoenzimas de la glutatión S-transferasa también tienen actividad frente a hidroperóxidos orgánicos, mientras que no la tienen frente al peróxido de hidrógeno.

-Actividad glutatión disulfuro reductasa: El glutatión disulfuro (GSSG) formado en las reacciones de peroxidación se reduce por acción del NADPH mediante una reacción catalizada por la glutatión reductasa. Por tanto, esta enzima mantiene el estado reducido del glutatión, necesario a su vez para muchos procesos de detoxificación celular.

-Actividad gamma glutamil transpeptidasa: enzima que cataliza la transferencia de un grupo gamma glutamilo del glutatión a moléculas aceptoras como el agua o algunos aminoácidos y péptidos [61]. Esta enzima suele estar asociada a la cara externa de la membrana celular y está presente en diversos tejidos y órganos, aunque es predominante en hígado.

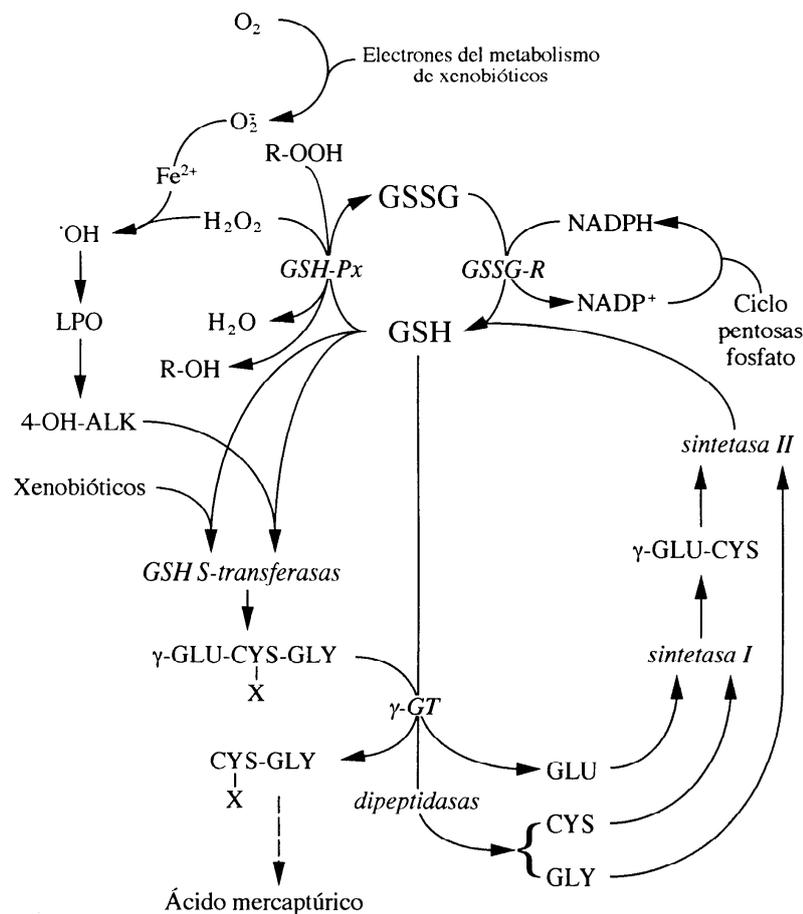


FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DEL SISTEMA GLUTATIÓN. (MEISTER A. 1998).

### 1.4.3 Otros antioxidantes naturales

Tal y como se ha mencionado anteriormente, además del sistema glutatión, existe un abundante conjunto de moléculas con capacidad antioxidante que participan en el mantenimiento del equilibrio del estado oxidativo. Entre ellos destacan las enzimas

superóxido dismutasa y catalasa o compuestos no enzimáticos como las vitaminas A, C y E.

a) Superóxido dismutasa (SOD).

Aproximadamente el 2% del oxígeno que se consume en la mitocondria en estado respiratorio 4, es transformado en radical superóxido en la cadena de transporte electrónico. La enzima SOD, cataliza su reacción de dismutación a peróxido de hidrógeno, el cual puede ser reducido de nuevo, mediante la acción de la catalasa o GPx [71,72].

Las variantes de estas enzimas son debidas al grupo prostético ligadas a ella. En eucariotas, tanto en la mitocondria y el citosol, se presentan estas variantes; la manganeso SOD (Mn-SOD), la extracelular SOD (EC-SOD) y cobre/zinc SOD (CuZn-SOD) que se localiza en el citosol [73].

b) Catalasa.

La catalasa es una enzima antioxidante localizada principalmente en los peroxisomas de las células de mamíferos [74], cuya principal función es reducir el peróxido de hidrógeno dando lugar a agua y una molécula de oxígeno [75].

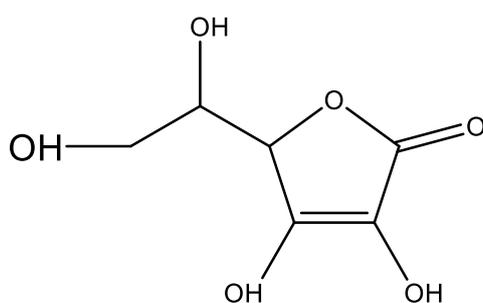
c) Otros antioxidantes naturales no enzimáticos.

La **vitamina E** pertenece a la familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles. La fuente principal de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, soja), frutos secos y otros alimentos como legumbres, lácteos o cereales. Es una molécula lipofílica presente en las membranas biológicas y en las lipoproteínas plasmáticas, capaz de inhibir la peroxidación lipídica al actuar como “scavenger” del radical peroxilo, generando a su vez hidroperóxidos y radical tocoperoxilo. Este radical puede transformarse en quinona en presencia de O<sub>2</sub>, la cual se elimina a través de la orina o bilis. Es importante destacar que su forma oxidada se puede reducir nuevamente en presencia de ácido ascórbico, ubiquinol o GSH, pudiendo actuar nuevamente de antioxidante [66,76].

Conviene recordar que la vitamina E también puede actuar de prooxidante, produciendo peroxidación en las LDL, facilitando la transferencia de la reacción de los radicales de la fase acuosa al interior del ambiente lipídico y que algunos estudios han

mostrado efectos contradictorios sobre los efectos de la vitamina E como suplemento antioxidante [77,78].

La **vitamina C** o ácido ascórbico es uno de los principales antioxidantes en fase acuosa, que actúa a nivel extracelular y citosólico, reaccionando con las especies oxigénicas reactivas, tales como:  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ROO\cdot$ ,  $OH\cdot$  y  $1O_2$ . En estas reacciones es oxidado a dehidroascorbato, pudiendo ser nuevamente reducido posteriormente por acción de la dehidroascorbato reductasa [79]. La principal fuente de vitamina C son las frutas y verduras y sus características físicoquímicas hacen que su acumulación en el organismo sea escasa, como ocurre en la mayoría de compuestos y vitaminas hidrosolubles. Su distribución es amplia en los tejidos, concentrándose en tejidos con metabolismo alto como; glándulas suprarrenales, la hipófisis, el hígado, el páncreas, el encéfalo y los ojos[80].



Ascorbic Acid

**FIGURA 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO. IMAGEN ORIGINAL DEL AUTOR.**

Los **polifenoles** se agrupan según su estructura química en dos grandes grupos: no flavonoides y flavonoides. Los flavonoides presentan gran variabilidad estructural, ya que pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta polifenoles con pesos moleculares superiores a los 30.000 Da[81]. Los flavonoides, se hallan en alimentos de origen vegetal, especialmente en las frutas (uvas, fresas, granadas y arándanos), en las verduras como cebollas, puerros, brócoli y tomates cherry, así como en el té, la cerveza y el vino tinto [82].

Entre los mecanismos de acción de los polifenoles se encuentran el secuestro de los radicales libres e inhibición de la acción de los ROS [83]o la reducción de la acción del

radical tocoferoxilo [84]. Así, se han visto implicados en la inhibición de la oxidación del colesterol LDL [85], la prevención de la rotura de la doble hélice del ADN o de la toxicidad por la quelación de metales [86]. Además, los polifenoles parecen intervenir en procesos antitumorales y antiinflamatorias [87,88].

Los **carotenoides** son compuestos poco polares, que tienen al menos nueve dobles enlaces conjugados, y absorben a longitudes de onda específicas, lo que les confiere sus colores característicos. Aunque se conocen alrededor de 600 carotenoides aislados, únicamente 50, al metabolizarse, generan vitamina A o retinol. Se dividen en dos subclases: las xantofilas (algo polares) y los carotenos muy poco polares. Los carotenos son carotenoides que no contienen oxígeno, como los a o b-carotenos o el licopeno, mientras que las xantofilas, como la criptoxantina, cantaxantina y la luteína, son carotenoides oxigenados que contienen grupos carboxilos y/o hidroxilos en sus grupos sustituyentes. Los carotenos participan en la reducción directa de la peroxidación lipídica y en la capacidad de estas moléculas para articular los niveles de otros antioxidantes [89] Por otro lado, existen datos procedentes de estudios en experimentación con animales y cultivos celulares que demuestran el papel de la luteína (xantofila) en la protección en diversas enfermedades en las que el estrés oxidativo está implicado como mecanismo fisiopatológico [90,91].

La vitamina A se obtiene por medio de la dieta en forma lipófila (retinol) e hidrófila (carotenoides). El derivado lipofílico se presenta en alimentos como el hígado de animales, carnes, yema de huevo, leche y sus derivados grasos, mientras que los carotenoides son aquellos pigmentos causantes del intenso color amarillo, naranja o rojo de frutas y verduras; se encuentran en alimentos como tomates, calabazas, mangos, zanahorias o espinacas.

El exceso de carotenoides en la dieta, implica la saturación de las vías de los enterocitos y en su mayoría son eliminados a la luz intestinal, básicamente por la bilis [92,93]. En la bilis se excreta un 1% de la fracción plasmática diaria y esta posiblemente es reabsorbida con posterioridad [94].

Los carotenoides presentan una gran actividad antioxidante [95,96] al contener en su estructura un extendido sistema de dobles enlaces conjugados, reaccionando frente al

oxígeno singlete, radical peroxilo, anión superóxido, ácido hipocloroso y otras especies reactivas. Sin embargo, su capacidad antioxidante está relacionada con los niveles de oxígeno existente. Así, por ejemplo, ante los radicales peroxilos, el  $\beta$ -caroteno constituye un eficaz finalizador de la cadena oxidativa, en el caso de que las presiones parciales de  $O_2$  ( $PO_2$ ) sean bajas. Por el contrario, si la  $PO_2$  es alta, el proceso oxidativo continúa, pudiendo llegar a ejercer incluso un efecto prooxidante [97] (Figura 7. Apartado a).

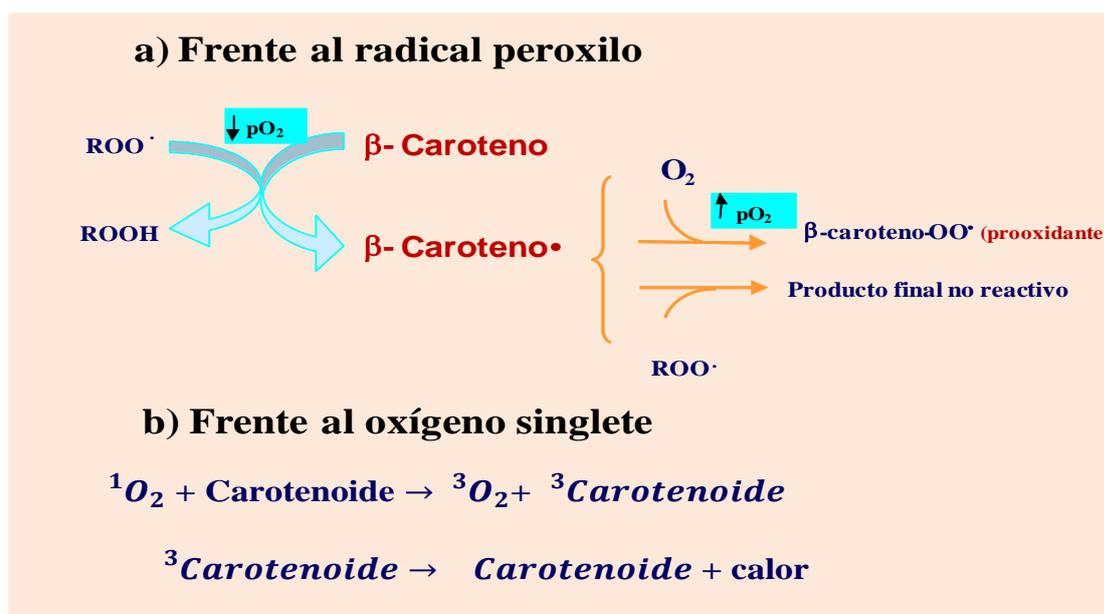


FIGURA 8 MECANISMOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CAROTENOIDES.

Además de las características fisiológicas, la actividad antioxidante, también depende de la estructura química de los carotenoides y del acompañamiento de otros antioxidantes. En este sentido, se sabe que los carotenoides con ocho o más dobles enlaces son mil veces más eficaces en la reacción con el oxígeno singlete, actuando por transferencia de energía de excitación al  $\beta$ -caroteno. Posteriormente la energía se elimina en forma de calor (Figura 7. Apartado b). De la misma forma, la actuación sinérgica del  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno incrementa el poder antioxidante del  $\beta$ -caroteno, posiblemente como medida de protección ante la autooxidación y debido a la inhibición de los efectos oxidantes peroxilo de  $\beta$ -caroteno, que se habría formado durante la acción antioxidante de este [97].

Los carotenos también repercuten en la reducción directa de la peroxidación lipídica y en la capacidad de estas moléculas para articular los niveles de otros antioxidantes [98].

#### 1.4.4. Dieta y estado oxidativo

Una dieta equilibrada es un pilar básico en la promoción y mantenimiento de la salud y un factor determinante en el desarrollo y evolución de enfermedades no transmisibles crónicas, especialmente en aquellas en las que el estrés oxidativo está implicado como mecanismo fisiopatológico. De hecho, la composición de la dieta desempeña un papel primordial en el estado oxidativo de los individuos, modulando tanto en el daño oxidativo como los mecanismos de defensa antioxidante. Así, una dieta no equilibrada puede fomentar los mecanismos prooxidantes celulares, mientras que, a través de las frutas, verduras y frutos secos se aportan antioxidantes exógenos capaces de aumentar la respuesta celular al estrés oxidativo [99].

Por tanto, cada vez hay más evidencia científica de los efectos beneficiosos de una dieta variada y rica en estos alimentos con capacidad antioxidante para la prevención de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo y el envejecimiento celular (la OMS recomienda una ingesta de frutas y verduras de unos 400g/día) [105]. Es importante recordar, no obstante, que el aporte de antioxidantes debe ser equilibrado, ya que el aporte aislado y no controlado de un solo tipo de antioxidantes puede conducir a efectos contrarios a los deseados [100].

### 1.5 SALUD Y DEPORTE

#### 1.5.1 Antecedentes

Cada vez más, tanto los organismos como las políticas públicas de salud enfatizan la necesidad de llevar a cabo actividad física regular y participar en deportes de intensidad moderada como medida preventiva contra enfermedades cardiovasculares, hipertensión y otras dolencias asociadas al sedentarismo. Además, se promueve la colaboración entre el sector público y privado con el fin de alcanzar este objetivo.

Investigaciones existentes respaldan los beneficios de la práctica deportiva en términos físicos, psicológicos y de calidad de vida en general [101]. En este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud han desarrollado el "Plan de Acción Mundial sobre Actividad Física 2018-2030: más personas activas para un mundo más saludable". Según este plan, el aumento del desarrollo económico de los países conlleva un incremento paralelo en los niveles de inactividad, y se destaca que en algunos países los niveles de inactividad pueden llegar al 70%, aunque ciertos grupos poblacionales enfrentan mayores dificultades para acceder a la práctica deportiva. Según el plan, la inactividad representa entre el 1% y el 3% de los costos nacionales de atención médica, sin tener en cuenta los costos asociados a otras condiciones de salud a nivel mental y musculoesquelético, ni los costos relacionados con la pérdida de productividad [102] [103].

Este mayor interés en la práctica deportiva ha dado lugar a un aumento progresivo en la participación de deportes de larga distancia, como es el caso de las maratones y Ultra Trails. Según Runnersworld, en 2019 el número de corredores que completaron una maratón o Ultra Trail aumentó un 10% en comparación con 2018 en España [103,104]. Además, la Federación de Montaña y Escalada (FEDME) ha constatado un incremento exponencial en el número de licencias, pasando de 9,000 en 1991 a 66,466 en 2002 y 203,860 en 2015. Paralelamente, se ha producido un aumento en el número de clubes de montaña, asociado al fenómeno conocido como "Boom del Trail Running" [103].

Las carreras o pruebas de montaña, también denominadas Trail Running, debido a que se desarrollan en terrenos no asfaltados, tuvieron un inicio tardío en España en comparación con otros países. El Trail Running surgió a principios del siglo XX, y desde entonces el número de eventos organizados ha experimentado un crecimiento del 1,000 % entre 2008 y 2019 [105,106]. De esta manera, gradualmente se han llevado a cabo más competiciones y pruebas deportivas en terrenos montañosos y entornos naturales [107,108].

En los últimos años, han surgido investigaciones como la realizada por Seguí e Inés en 2018 [108], donde se analizan los cambios en los hábitos deportivos durante las últimas dos décadas en España. Sin embargo, a pesar del aumento de la demanda por parte de

participantes no profesionales, quienes carecen de un apoyo específico en términos de fisiología, nutrición y atención médico-deportiva para su preparación, aún se carece de suficientes evidencias científicas en cuanto a la salud de los participantes, resultando necesario que la comunidad científica se plantee investigaciones acerca del impacto de este tipo de prácticas deportivas en la salud.

### 1.5.2 El Proyecto CRS. Maratón Valencia 2016.

El planteamiento de esta tesis doctoral tiene sus primeros antecedentes en el Proyecto CRS (Corre, Recupera, Repite y Siempre Saludable), llevado a cabo durante la Maratón Valencia Trinidad Alfonso EDP en 2016. Este proyecto adoptó un enfoque multidisciplinar en el campo de la salud y fue desarrollado por el Servei d'Esports, el Grupo de Investigación de Cuidados y Salud (CyS) de la Universitat Jaume I (UJI), en colaboración con la Fundación Trinidad Alfonso, Hospitales Vithas-Nisa, la SD Correcaminos y la Diputació de Castelló.

El objetivo de este proyecto fue observar y analizar los cambios que ocurren en el organismo de los atletas en términos de salud, utilizando indicadores clínicos y de esfuerzo, con el fin de mejorar las capacidades de los deportistas desde una perspectiva saludable. El Proyecto CRS permitió realizar una completa evaluación física y psicológica de los participantes en la Maratón Valencia Trinidad Alfonso EDP de 2016 y analizar los cambios fisiológicos condicionados por la realización de una maratón. En relación con el aspecto mental, se analizaron variables psicológicas y conductuales, considerando que la práctica de deportes extremos estimula la liberación de endorfinas [109,110].

La repercusión internacional de la Maratón de Valencia también facilitó la amplia divulgación y difusión de los resultados de la investigación. Sin embargo, existen interrogantes que esta tesis se propone analizar con el objetivo de avanzar en las explicaciones proporcionadas. Para lograrlo, se plantea la ampliación del estudio, incluyendo pruebas de mayor distancia y centrándose en abordar y resolver algunas cuestiones relacionadas con el estudio de los antioxidantes en el organismo, basándose en las evidencias halladas en el Proyecto CRS. En este sentido, se ha seleccionado la prueba Penyagolosa Ultra Trail para llevar a cabo dicho proyecto.

### 1.5.3 Proyecto PTS Woman. Penyagolosa Ultra Trail 2019.

El Proyecto PTS Woman, desarrollado por el Grupo de Investigación Cuidados y Salud (CyS), llevó a cabo un análisis de la muestra obtenida en la prueba Penyagolosa Ultra Trail 2019 a través del proyecto PTS Woman. Esta prueba tiene lugar entre Castelló de la Plana (inicio) y el Santuario de Sant Joan de Penyagolosa (llegada), en el Parc Natural del Penyagolosa. Se considera una de las siete pruebas más importantes del calendario nacional de Ultra Trail y ocupa el cuarto lugar en términos de participación e inscripciones en España.

El proyecto PTS Woman surge con el propósito de abordar deficiencias e incógnitas observadas en el primer Proyecto CRS en relación con las diferencias entre sexos, el estudio de variables relacionadas con el metabolismo antioxidante no estudiados y otros datos que requerían un mayor número de casos y distancias más largas para su análisis. Se observó que existían muy pocos estudios sobre el impacto de estas prácticas deportivas en las mujeres, posiblemente debido a la baja participación femenina debido a dificultades para conciliar la vida familiar y otras razones no identificadas. La alta participación en la Ultra Trail Penyagolosa ofrecía una oportunidad para validar el estudio con una muestra suficiente de mujeres.

Las publicaciones derivadas del Proyecto PTS Woman han abordado temas como la función cardiaca, los marcadores musculares, cardiovasculares e inflamatorios, el efecto de los calambres y las recuperaciones fisiológicas y de fuerza después de la prueba.

Sintetizando, el Proyecto PTS Woman es una investigación que busca analizar las repercusiones en la salud de la realización de la Penyagolosa Ultra Trail, centrándose en las diferencias entre sexos, los hábitos de nutrición, la preparación y recuperación de las carreras, así como los aspectos fisiológicos y de bienestar mental. Los resultados obtenidos hasta el momento han permitido identificar diferencias y establecer relaciones entre diversos factores que influyen en el rendimiento y la salud de los corredores de Ultra Trail.

En relación a las diferencias entre hombres y mujeres en las carreras de Ultra Trail, se han llevado a cabo diversos estudios. Uno de ellos se centró en analizar el ritmo de carrera mediante el uso de acelerómetros en una prueba de 109 km[111]. Se realizaron

pruebas cardiopulmonares y de esfuerzo antes de la carrera, en tres puntos intermedios (33 km, 66 km y 84 km) y después de la misma. Se compararon los ritmos de carrera absolutos y relativos entre hombres y mujeres. Los resultados mostraron que las mujeres fueron más constantes, sin tiempos excesivos de descanso, y presentaron menos pérdida de peso corporal y variaciones menores en las velocidades absolutas y relativas. Las fluctuaciones en el peso corporal se relacionaron con las variaciones en la velocidad de carrera.

Otro estudio se centró en la utilización de medias de compresión en pruebas de larga distancia, como una Ultra Trail de 107 km [112]. Se analizaron los parámetros de daño muscular, como lactato deshidrogenasa, creatina quinasa, proteína C reactiva y creatinina, mediante análisis de marcadores sanguíneos antes, inmediatamente después, a las 24 y 48 horas después de la carrera. Se compararon dos grupos de 32 atletas (19 hombres y 13 mujeres), donde el grupo que utilizó las medias de compresión mostró un menor aumento en la escala de dolor en la parte posterior de la pierna. Aunque las medias de compresión no parecen reducir el daño muscular y la inflamación, sí se observó que su uso puede recomendarse como método de recuperación para disminuir el dolor muscular [113].

La función pulmonar también ha sido objeto de estudio en Ultra Trails. Se realizaron pruebas espirométricas para evaluar la función de los músculos pulmonares e inspiratorios y analizar posibles diferencias entre hombres y mujeres en relación con el cambio antes, durante y después de la carrera [114]. Los parámetros espirométricos evaluados incluyeron capacidad vital forzada (FVC), volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1), FEV1 / FVC y flujo espiratorio máximo (PEF), así como la presión inspiratoria máxima (MIP). Además, se evaluaron la altura del salto (SJ) y la fuerza de la mano (HG) antes y después de la carrera, y se realizaron mediciones en tres puntos intermedios durante la misma. Los resultados mostraron una disminución del PEF durante la carrera, en paralelo con la caída de la velocidad de carrera. No se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres en la función respiratoria posterior a la carrera, excepto por una mayor disminución en la relación FEV1 / FVC entre las mujeres. En conclusión, la disminución de la función respiratoria antes y después de la carrera no se correlacionó con la velocidad de carrera relativa.

Además, se ha investigado la relación entre el consumo máximo de oxígeno, los umbrales ventilatorios y la oxidación de grasas, comparando ambos sexos y evaluando las variaciones corporales en grasa y masa magra observándose diferencias de género en estos aspectos [115].

En cuanto a la preservación del material genético, se planteó la pregunta de si el deporte excesivo o las pruebas de larga duración pueden llevar a un desgaste de los telómeros debido a la sobreexpresión del ADN. Se realizó un análisis clínico de hematología en los participantes de la prueba Ultra Trail Penyagolosa Ultra Trail CSP 2018 en comparación con un grupo de 56 individuos sedentarios [116]. Se comparó el componente genético de los participantes antes y después de la prueba, y se observó un incremento en la inflamación, destrucción y aparición de moléculas de degradación en el organismo durante la prueba, lo que podría llevar al acortamiento de los telómeros y a un posible envejecimiento celular progresivo debido a la sobreexpresión del ADN. Se evaluaron la eficiencia antioxidante y el mantenimiento de los telómeros, específicamente en relación con el estrés oxidativo y su impacto en el gen superóxido dismutasa 2 (SOD<sub>2</sub>) y su polimorfismo rs4880. Los resultados mostraron que los corredores de Ultra Trail que entrenaban de forma más constante y regular presentaban menos acortamiento de los telómeros y una mayor cantidad de los mismos.

Estos estudios demuestran la importancia de entender las diferencias entre hombres y mujeres en las carreras de Ultra Trail, tanto a nivel fisiológico como genético, con el objetivo de mejorar el rendimiento, prevenir lesiones y promover una óptima recuperación.

### 1.6 Estado actual de la investigación.

Enmarcados en el proyecto PTS Woman, esta tesis centra su trabajo en el estudio del estrés oxidativo asociado a la Penyagolosa Ultra Trail. Anteriormente se ha investigado el impacto de las carreras de Ultra Trail en relación con el estrés oxidativo y las alteraciones causadas por las especies reactivas de oxígeno (ROS) [117–119].

Se ha observado que las pruebas de alto consumo metabólico, como las carreras de Ultra Trail, pueden generar efectos inflamatorios y un aumento en las especies reactivas producidas por la oxidación y destrucción celular. Estos efectos pueden desencadenar una

insuficiencia renal aguda en los corredores, aunque esta condición puede revertirse en poco tiempo con una hidratación adecuada dentro de las 48 horas posteriores [120]. Por lo tanto, es relevante ampliar el trabajo de esta tesis para examinar los efectos de las ROS en la salud de los corredores, así como la posible pérdida de rendimiento y la fatiga muscular.

Diversos estudios han aportado datos dispares en relación a los efectos de las carreras de ultrarresistencia sobre el daño oxidativo y los posibles efectos compensatorios de los antioxidantes, sin que haya un consenso en la bibliografía [121-128]. Dada la popularidad de este tipo de pruebas y el creciente número de participantes en las mismas, surge la necesidad de generar evidencias sobre el impacto que este tipo de carreras pueden tener sobre el estado oxidativo del plasma de los corredores y su relación con el daño muscular y la pérdida de fuerza. Además, es importante hacer un estudio que incluya la perspectiva de género así como la influencia de la edad de los corredores sobre los marcadores a estudio planteados en esta tesis doctoral.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

La realización de un ejercicio de Ultra Trail como la Ultra Trail Castelló-Panyagolosa altera el estado oxidativo del suero de los corredores, afectando a su vez a la magnitud del daño muscular, la pérdida de fuerza del músculo esquelético y la respuesta inflamatoria que se observan al finalizar la misma, así como su recuperación posterior.

### OBJETIVOS

#### Objetivo general:

Determinar el impacto del ejercicio de Ultra-trail sobre el estado oxidativo del plasma y su relación con el daño muscular y la respuesta inflamatoria en una muestra de corredores amateurs.

#### Objetivos específicos:

Los objetivos específicos planteados en el presente proyecto son los siguientes:

1. Determinar el estado oxidativo del plasma de los corredores, previo a una prueba de Ultra Trail y como éste se modifica tras la finalización de la prueba y su evolución posterior a las 24 y 48 horas.
2. Analizar la magnitud del daño muscular, la pérdida de producción de fuerza del músculo esquelético y la respuesta inflamatoria tras la realización de prueba de Ultra Trail y su evolución posterior a las 24 y 48 horas.
3. Evaluar si existe una relación entre el estado oxidativo del suero de los corredores y los parámetros de daño muscular, fatiga y respuesta inflamatoria sistémica en corredores amateurs que realizan una prueba de Ultra Trail.
4. Estudiar si el género o la edad de los corredores pueden afectar de forma diferencial a los resultados obtenidos en relación con el impacto de una Ultra Trail sobre el

estado oxidativo del plasma, daño muscular, pérdida de fuerza y respuesta inflamatoria en corredores amateurs.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Participantes

Cuarenta y siete atletas amateurs de ultra resistencia (29 hombres y 18 mujeres) fueron reclutados para participar en el estudio que se llevó a cabo en la carrera Penyagolosa Ultra Trail CSP en 2019. La carrera constaba de 107,4 km, comenzando a una altitud de 40 m y finalizando a 1280 m sobre el nivel del mar, con una elevación positiva total de 5604 metros y negativa de 4356 metros. Todos los sujetos fueron informados previamente del procedimiento del estudio y dieron su consentimiento por escrito para participar. También se les permitió retirarse del estudio si así lo deseaban. Se utilizó un cuestionario confeccionado adhoc para recopilar las variables sociodemográficas, las variables de entrenamiento y de competición, así como el consumo de suplementos antioxidantes en la preparación y desarrollo de la carrera.

#### 3.1.1 Comité ético

La investigación se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Universidad Jaume I de Castellón (Número de Expediente CD/007/2019).

Este estudio está registrado en la base de datos ClinicalUltra Trail.gov, con el número de código NCT03990259 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

### 3.2. Variables de estudio

#### 3.2.1 Variables sociodemográficas, de entrenamiento y rendimiento en carrera

Se recogieron la edad y el sexo, así como variables relacionadas con el entrenamiento semanal y la experiencia previa de participación en carreras de Ultra Trail.

Como rendimiento en carrera se tuvo en cuenta el tiempo de finalización de la prueba.

### 3.2.2 Variables de estrés oxidativo

Los marcadores de estado oxidativo utilizados en la presente investigación fueron las enzimas antioxidantes GR y GPx, así como los indicadores de daño oxidativo a biomoléculas MDA (marcador de peroxidación lipídica) y CG (daño oxidativo a proteínas).

### 3.3. Instrumentación necesaria para los métodos de análisis:

Instrumentación necesaria para los métodos de análisis:

Cromatografía líquida de alta resolución Agilent compuesto por:

- Bomba cromatográfica: Agilent Technology 1100 series binary HPLC Pump.
- Degasificador Agilent Technology de fases móvil serie 1100.
- Detector de fluorescencia FLD Agilent Technology 1200 con celda de 8 $\mu$ L.
- Detector de Diodos (DAD) Diode Array Detection Agilent Technology 1100 series.
- Inyector: Agilent Technology 1050 con loop de 100  $\mu$ l..
- Ordenador IBM Window 2000 Pro.
- Software: HP ChemStation.
- Espectrofotómetro: Kontron Instruments modelo Uvikon 922.

Centrífugas:

- Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo SS-34.
- Centrífuga refrigerada Heraeus, Megafuge 1.0.
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5415 R.
- Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Sepatech 200.
- Centrífuga de mesa Heraeus Sepatech, modelo Labofuge Ae.

- Hettich zentrifugen Universal 320 R.
- Balanzas:
  - Balanza de precisión Mettler, modelo AM-100.
  - Balanza Ohaus, modelo Navigator TM.
- Otros equipos:
  - pHmetro Crison, modelo microph 2001. Hamilton Liq-Glass.
  - Homogeneizador: Junke and Kunkel, IKA-Werk, modelo RW 20 DZM.
  - Sistemas de tratamientos de agua: Milli Q gradiente A10 de Millipore.
  - Baños termostáticos de temperatura regulable de Selecta modelo Tectron 3471300 y Barnstead/Lab-Line modelo Max Q 7000.
  - Agitadores magnéticos Minishaker IKA, modelo MS2, Heidolph modelo MR 3001 K y SBS modelo A-163, Lab-Line Instruments Inc.
  - Lector de placas: Bio-Rad, modelo BENCHMAK, Microplate reader.
  - Ultracongeladores, congeladores y neveras.

### 3.4 Toma de muestras de sangre y determinaciones analíticas

Se recolectaron muestras de sangre de una vena antecubital mediante venopunción el día antes de la carrera, después de cruzar la línea de meta, así como 24 y 48 horas después de la carrera, utilizando tubos BD Vacutainer PST II. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante diez minutos y el suero recogido se alicuotó en dos tubos que se mantuvieron a 4°C durante el transporte al Hospital Vithas Rey Don Jaime (para el estudio de inflamación y daño muscular) y a las instalaciones de la Universitat Jaume I (para el estudio del estado oxidativo del plasma), respectivamente.

Los resultados bioquímicos obtenidos inmediatamente después de la carrera se ajustaron utilizando el método de Dill y Costill [20], utilizando el hematocrito y la hemoglobina para determinar la magnitud de los cambios en el volumen plasmático después de la carrera en cada participante.

### 3.5 Parámetros de inflamación y daño muscular

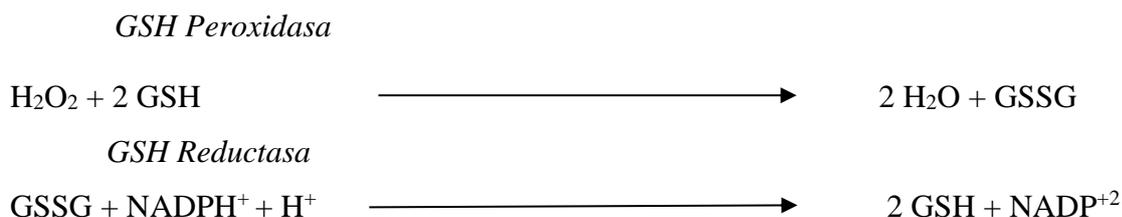
La muestra derivada al Hospital Vithas Rey Don Jaime se procesó utilizando el analizador de química clínica modular Roche/Hitachi Cobas c311 (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania), como se ha publicado anteriormente [109,129,130]. La deshidrogenasa láctica (LDH) y la creatina quinasa (CK) se utilizaron como marcadores de daño muscular, la proteína C-reactiva (PCR) como indicador de reacción inflamatoria aguda.

### 3.6 Marcadores de estado oxidativo:

#### 3.6.1 Determinación de actividad glutatión peroxidasa GPx

La actividad de esta enzima, que cataliza la oxidación de GSH a su disulfuro (GSSG) por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se determinó espectrofotométricamente según el método de Lawrence et al. (1978)[131], mediante la monitorización de la oxidación de NADPH a 340 nm tal y como se describe a continuación:

#### Reacciones:



#### Soluciones:

Solución 1. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, que contiene EDTA 1 mM y azida sódica 1mM.

Solución 2. Glutation Disulfuro reductasa 2.4 UI/mL.

Solución 3. GSH 10 mM.

Solución 4. NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO<sub>3</sub> al 0.1%.

Solución 5. Peróxido de hidrógeno 1.5 mM.

### Procedimiento

**Paso 1:** Consiste en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

- 500 µL de la solución 1,
- 25 µL de muestra completada hasta 75 µL con agua MilliQ.
- 100µL de la solución 2.
- 100µL de la solución 3.

Se preincuba esta muestra durante 5 min a 37° C.

**Paso 2:** Se añaden 100 µL de la solución 4. Se monitoriza durante 3 min el consumo de NADPH, no dependiente de hidroperóxidos.

**Paso 3:** Se añaden 100 µL de la solución 5 precalentada, y se registra de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 3-5 min (que es resultado del consumo de NADPH).

El cálculo de la actividad GPx se realiza determinando la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido.

$$c = \frac{Vf}{\epsilon \times d \times Vm} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \text{ (mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1}\text{)}$$

Vf = volumen final en mL, Vm= volumen de muestra en mL,  $\epsilon$ =coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de  $6.22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ), d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso),  $\Delta A$  = disminución de la absorbancia a 340 nm,  $\Delta t$  = intervalo de tiempo considerado, en minutos.

Los resultados se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

### 3.6.2 Determinación de la actividad GR

#### Fundamento del método.

La actividad glutatión reductasa (GR; E.C.1.8.1.7) se determinó según el método propuesto por Smith [132] según el cual el GSH se redujo al ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), basándose en las siguientes reacciones:



La formación del GSH está catalizada por la actividad glutatión reductasa de la muestra a través de la reducción del NADPH. Cuando esta reducción sucede en presencia de DTNB, se forma el aducto DTNB con GSH (GSTNB), que luego se descompone en TNB (ácido 2-nitro-5-sulfanilbenzoico), cuya aparición se registra espectrofotométricamente a 412nm.

Soluciones:

- Solución 1. Tampón fosfato sódico 0.2 M, pH 7,5.
- Solución 2. EDTA 10 mM.
- Solución 3. DTNB 3mM en tampón fosfato sódico 10 mM a pH 7,5.
- Solución 4. NADPH 2 mM disuelto en tampón fosfato sódico de la Solución 1).
- Solución 5. GSSG 20 mM.

#### Procedimiento.

El procedimiento analítico consiste en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

1. 450  $\mu\text{L}$  de la solución 1.
2. 50  $\mu\text{L}$  de solución 2.
3. 250  $\mu\text{L}$  de solución 3.

4. 50  $\mu\text{L}$  de solución 4
5. 50  $\mu\text{L}$  de solución 5.
6. 125  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ
7. 25  $\mu\text{L}$  de muestra.

La mezcla se incuba a 37° y se monitoriza durante 3 min la aparición de TNB a 412 nm (tomando como valor final la pendiente de la recta de regresión que representa el incremento de absorbancia en el intervalo de tiempo considerado).

Es necesario hacer una curva de calibrado con concentraciones conocidas de GR. El cálculo de la actividad GR se realiza mediante intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

### 3.6.3 Determinación de la concentración de MDA

#### Fundamento del método.

La cuantificación del MDA de las muestras de suero, se realizó mediante una modificación del método de Richard [133,134], determinando la formación del complejo que se crea entre el MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en una proporción de dos moléculas de TBA con una de MDA. Esta determinación se realiza en un equipo de HPLC que consta de los siguientes instrumentos necesarios para los métodos de análisis de MDA en suero:

- Bomba cromatográfica: Agilent Technology 1100 series binary HPLC Pump.
- Degasificador Agilent Technology de fases móvil serie 1100.
- Detector de fluorescencia FLD Agilent Technology 1200 con celda de 8 $\mu\text{L}$ .
- Detector de Diodos (DAD) Diode Array Detection Agilent Tecnología 1100 series.
- Inyector: Agilent Technology 1050 con loop de 100  $\mu\text{l}$ .
- Ordenador IBM Window 2000 Pro.

- Software: HP ChemStation

#### Centrífugas:

- Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo SS-34
- Centrífuga refrigerada Heraeus, Megafuge 1.0
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5415 R
- Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Sepatech 200

#### Balanzas:

- Balanza de precisión Mettler, modelo AM-100.
- Balanza Ohaus, modelo Navigator TM.

#### Otros equipos:

- pHmetro Crison, modelo microph 2001. Hamilton Liq-Glass.
- Homogeneizador: Junke and Kunkel, IKA-Werk, modelo RW 20 DZM.
- Sistemas de tratamientos de agua: Milli Q gradiente A10 de Millipore.
- Agitadores magnéticos Minishaker IKA, modelo MS2, Heidolph modelo MR 3001 K y SBS modelo A-163, Lab-Line Instruments Inc. USA.
- Lector de placas: Bio-Rad, modelo BENCHMAK, Microplate reader.

La fase móvil utilizada está compuesta por tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol, en una proporción de 580 ml de tampón y 420 ml de metanol. Dicha fase móvil se filtra a través de un filtro-membrana (Scheicher and Schuell) de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro y 47 mm de diámetro. El flujo de fase móvil es de 1.0 ml/min a lo largo de todo el procedimiento. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553nm.

La solución para realizar la curva de calibración se prepara diariamente y consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol.

La solución de trabajo también se prepara diariamente y consiste en una mezcla de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente.

#### Procedimiento.

Se mezclan 0.1 ml de muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo que se incuba 60 min en un baño de agua a 95°C. Tras la incubación se detiene la reacción enfriando los tubos en un baño de agua-hielo (4°C) durante 10 min y posteriormente se centrifugan 10 min a 12.000 rpm.

El aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro por lo que se añaden 0.1 ml de hidróxido potásico 0.7 M a 0.2 ml de la muestra centrifugada que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después centrifugamos durante 1 min para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación. A continuación, la muestra se filtra (filtro de jeringa de 3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company) y se inyecta en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra inyectada fue de 100 µl para tener la seguridad de llenar el loop de 50 µl.

En cada experimento se preparó una curva de calibración de estándares (0; 0,2; 0,4; 0,5; 1; 1,5 y 2µM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol tal y como se ha descrito anteriormente).

El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

### 3.6.3 Determinación de grupos carbonilo en proteínas

La introducción de grupos carbonilo en las cadenas laterales de los aminoácidos es un sello distintivo de la degradación oxidativa de las proteínas. La cuantificación de estos grupos carbonilo, como marcador de daño oxidativo a las proteínas del suero, se realizó mediante su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en medio ácido, según el

método descrito por Levine et al. [135], con algunas modificaciones introducidas por Tian et al.[136]. Así, la unión de DNFH a los grupos carbonilo de las proteínas se cuantificó colorimétricamente ( $\lambda = 373$  nm) tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina.

#### Procedimiento:

Tomamos 200  $\mu$ L de suero a los que se añadieron 400 mL de 2,4 DNFH 10 mM /CIH 2,5 M. Incubamos 1 hora a temperatura 40°, con agitación ocasional.

1. Centrifugamos a 12600 rpm durante 3 minutos y añadimos 1 mL de TCA al 20 %.
2. Centrifugamos a 12600 rpm durante 3 minutos.
3. Recogemos el pellet y lo lavamos 3 veces con 1 mL de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v). Centrifugamos otra vez a 12600 rpm durante 3 minutos y recogemos el pellet.
4. Se resuspende el pelet con 1 mL de Guanidina 6 N a pH: 2,3, agitamos con un vortex durante 2 minutos y centrifugamos a 12600 rpm.

Finalmente medimos el sobrenadante a una  $\lambda = 373$  nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 22,000/M·cm.

Para los cálculos se restó la absorbancia del blanco realizado con agua y expresándose los resultados dividiendo por el número de proteínas totales de la muestra.

### 3.7. Fuerza muscular. Evaluación de la Fuerza Squat Jump (SJ) y Handgrip (HG)

La fuerza muscular del tren superior fue determinada utilizando técnicas de dinamometría Manual a través del Hand Grip (HG) y del tren inferior a través de una plataforma de salto (Squat Jump). Los sujetos se familiarizaron con los procedimientos de evaluación de la fuerza durante una sesión informativa previa a la investigación. Las pruebas de HG y SJ se realizaron antes de la carrera y dentro de los 15 minutos posteriores a la carrera. En la evaluación de HG, los sujetos se mantuvieron de pie, con el brazo a su lado con extensión completa del codo, sosteniendo el dinamómetro de agarre (T.K.K. 5401 GRIP-D, Takei Scientific Instruments Co., Tokio, Japón) en su mano dominante. Se les pidió que apretaran el dinamómetro durante 5 segundos y la prueba se realizó dos veces,

con 30 segundos de descanso entre intentos. Se registró el valor máximo de cada individuo para el análisis estadístico. Siguiendo estudios anteriores [114,137], se analizó el cambio de HG de pre a post carrera, considerando que los músculos del miembro superior podrían considerarse como músculos que apenas se ejercitan durante la carrera. En la evaluación de SJ, se pidió a los participantes que saltaran lo más alto posible desde una posición inicial con las caderas y las rodillas flexionadas 80 grados y las manos estabilizadas en las caderas para evitar el movimiento de los brazos. La altura del salto se estimó mediante el tiempo de vuelo medido con una plataforma de contacto (Chronojump, Barcelona, España). La prueba se realizó dos veces, con 90 segundos de descanso entre intentos. Se seleccionó el mejor rendimiento de cada individuo para el análisis estadístico.

El dinamómetro Hand Grip, como podemos observar en la figura es de la marca Takei Scientific Instruments Co, Tokyo, Japón. Modelo TKK 5401 Grip-D.



FIGURA 9. HANG GRIP UTILIZADO. IMAGEN ORIGINAL DEL AUTOR.

### 3.8 Análisis estadístico

Se llevaron a cabo los análisis estadísticos utilizando el software Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics para Windows, versión 25.0, IBM Corp., Armonk, NY EEUU). Para asegurar la validez de los análisis, se verificó la distribución normal de las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk, considerando un valor de  $p > 0,05$  como indicativo de normalidad [138].

Para evaluar si las concentraciones de biomarcadores de estrés oxidativo (GR, GPX, MDA y CG) estaban interrelacionadas o si guardaban alguna relación con la pérdida de fuerza en las extremidades superiores (HG) e inferiores (SJ), se utilizaron análisis de correlación de Pearson o Rho de Spearman. Adicionalmente, se examinó si estos biomarcadores estaban vinculados con variables hematológicas que indican inflamación sistémica (CRP) y daño muscular (CK, LDH), así como con los resultados obtenidos en pruebas de esfuerzo cardiopulmonar. Los valores de estas variables (GR, GPX, MDA, CG, HG, SJ, CRP, CK y LDH) se midieron después de la carrera y a las 24 y 48 horas, comparándolos con los niveles individuales previos a la carrera para calcular las puntuaciones delta (D). Estas puntuaciones delta (D) se calcularon como el incremento relativo:  $D$  (incremento múltiple) = (valor post-carrera – valor pre-carrera) / valor pre-carrera [139].

Por otra parte, las variables cuantitativas relacionadas con el estrés oxidativo se compararon mediante pruebas t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, dependiendo de la distribución de los datos, en cada uno de los momentos en los que se realizaron las mediciones (pre-carrera, línea de meta, 24 y 48 horas después de la carrera). Cuando existían dos categorías, se utilizaron las pruebas mencionadas, mientras que, en el caso de que hubiera más de dos categorías, se emplearon la prueba ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis. Las comparaciones post-hoc se realizaron con el ajuste de Bonferroni para corregir el error asociado a múltiples comparaciones.

La significancia de los resultados obtenidos se evaluó a través del tamaño del efecto estimado parcial ( $\eta^2$  parcial) en los análisis ANOVA, y mediante el tamaño del efecto de Cohen (d) para las comparaciones por pares. En este contexto, se consideró un tamaño del

efecto pequeño para valores de  $d$  de Cohen  $< 0.5$ ; moderado para valores entre  $0.5$  y  $0.8$ ; y grande para valores  $> 0.8$ . De igual manera, se consideraron fuertes las correlaciones con valores superiores a  $0.5$ , moderadas las que oscilaban entre  $0.3$  y  $0.5$ , y pequeñas aquellas por debajo de  $0.3$ . Se estableció un nivel de significancia estadística en  $p < 0.05$ , y los datos se presentaron como medias junto con su error estándar correspondiente (SEM).

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple utilizando el método paso a paso hacia adelante (forward stepwise), seleccionando únicamente aquellas variables dependientes que mostraban una distribución normal. Entre los modelos resultantes, se aplicó el principio de parsimonia para seleccionar el más adecuado [140][96]. Dado el tamaño limitado de nuestra muestra y la distribución no normal de algunas variables independientes, se revisaron los errores residuales de los modelos para garantizar su distribución normal, lo que a su vez refuerza la confiabilidad de nuestros modelos de regresión [141]. Para determinar el valor predictivo de los modelos, se aplicó el criterio de Cohen a los modelos ANOVA de una vía. Según este criterio, un valor de  $R^2$  menor de  $0.10$  indica un valor explicativo irrelevante; un  $R^2$  entre  $0.10$  y  $0.25$  sugiere una dependencia moderada en la explicación de la varianza de las variables analizadas; y un  $R^2$  superior a  $0.25$  permite concluir que el modelo explicativo posee relevancia clínica.



## 4. RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análisis descriptivo de la muestra de estudio

#### 4.1.1 Características de los sujetos, rendimiento en carrera y hábitos de entrenamiento. Por sexo

La muestra de corredores estuvo compuesta por un total de 47 corredores (18 mujeres / 38,29%), de los que finalizaron 32 corredores (68 %). De los corredores finishers el 59,4% (n=19) eran hombres y el 40,6% (n= 13) mujeres.

A continuación, se muestra en la tabla 2 las características descriptivas de lo/as atletas con relación a la edad en años, los tiempos de finalización de la carrera, en minutos y el consumo de complementos nutricionales en relación al sexo. Destacamos que no encontramos diferencias significativas en los análisis realizados intragrupo en ninguna de las variables estudiadas.

**TABLA 1 CARACTERISTICAS DE LOS SUJETOS, RENDIMIENTO DE CARRERA Y HÁBITOS DE ENTRENAMIENTO POR SEXO.**

Variable		Media (% DesvEst)	P
Edad	Total	40,9 ( $\pm$ 5.55)	0,157
	Hombres	40,1 ( $\pm$ 5.21)	
	Mujeres	42,2 ( $\pm$ 6.0)	
Tiempo en carrera (min.)	Total	1282 ( $\pm$ 208)	0.100
	Hombres	1243 ( $\pm$ 238)	
	Mujeres	1340 ( $\pm$ 144)	
Más de 10 años corriendo	Total	25 (54.3%)	0.895
	Hombres	15 (53.6%)	
	Mujeres	10 (55.6%)	
	Total	2.5 $\pm$ 3.3	0.170
	Hombres	3.0 $\pm$ 0.6	

<b>N° de Carreras</b>			
<b>finalizadas superiores a 100 Kms previas</b>	Mujeres	2.0 ± 1.1	
<b>Días de entrenamiento</b>			
<b>semanal</b>	Total	4.8 ± 1.2	
	Hombres	4.7 ± 0.3	0.491
	Mujeres	4.8 ± 0.3	
<b>Distancia en</b>			
<b>Kilómetros de entrenamiento semanal</b>	Media	70 ± 22	
	Hombres	71 ± 5.8	0.377
	Mujeres	74 ± 3.7	
<b>Horas de</b>			
<b>entrenamiento semanal</b>	Total	9.6 ± 4.2	
	Hombres	10 ± 0.9	0,286
	Mujeres	9 ± 1.3	
<b>Complementos</b>			
<b>nutricionales</b>	Total	62,5% n=20	
	Hombres	57,9% n=11	0.265
	Mujeres	69,2% n=9	

Los valores son presentados con media y Desviación Estándar. \*p<0,005 vs Hombres y Mujeres.

#### 4.1.2 Características de los sujetos, rendimiento en carrera y hábitos de entrenamiento. Por grupos de edad

A continuación, se muestra en la tabla 3 las características descriptivas de lo/as atletas con relación a la edad en años, los tiempos de finalización de la carrera, en minutos, los hábitos de entrenamiento semanales y el consumo de complementos nutricionales en relación con los distintos grupos etarios.

Se muestra la media de los participantes en total y diferenciando los valores por grupos de edades. El grupo de Jóvenes entre 30 hasta 36 años, Mediana edad 37 a 45 años y Seniors mayores de 45 años. Se muestran las medias y desviaciones estándar. En la única variable en la que aparecen diferencias significativas es en el volumen de

entrenamiento semanal (en Kilómetros) entre el grupo de corredores seniors y los jóvenes y de mediana edad.

**TABLA 2 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS, RENDIMIENTO EN CARRERA Y HÁBITOS DE ENTRENAMIENTO POR GRUPOS ETARIOS**

<b>Variable</b>		<b>Media ± DesvEst</b>	<b>P</b>
<b>Edad (Años)</b>	Total	40.94 (± 5.55)	
	Jóvenes	34.6 (± 1.8)	
	Mediana edad	41.4 (± 2)	
	Seniors	48 (± 3)	
<b>Tiempo en carrera (min.)</b>	Total	1282 (± 208)	
	Jóvenes	1313 (± 232)	
	Mediana edad	1197 (± 196)	0.086
	Seniors	1393 (± 208)	
<b>Más de 10 años corriendo</b>	Total	25 (54.3%)	
	Jóvenes	6 (35.71%)	0.174
	Mediana edad	9 (56.3%)	
	Seniors	10 (71.4%)	
<b>Carreras finalizadas superiores a 100 Kms previas</b>	Total	2.5 ± 3.3	
	Jóvenes	2 ± 1.1	0.307
	Mediana edad	2.4 ± 1.0	
	Seniors	3.1 ± 0.5	
<b>Días de entrenamiento semanal</b>	Total	4.7 ± 1.09	
	Jóvenes	4.81± 1.04	
	Mediana edad	5.13 ±0.95	0.158
	Seniors	4.36±1.21	
<b>Distancia en Kilómetros de</b>	Total	70 ± 22	
	Jóvenes	79.3 ± 8.4	<0.001
	Mediana edad	73.4±5.1	

<b>entrenamiento semanal</b>	Seniors	53.3± 4.5*	
<b>Horas de entrenamiento semanal</b>	Total	9.37 ± 3.77	
	Jóvenes	9.88± 4.74	
	Mediana edad	9.19± 2.99	0.802
	Seniors	9± 3.53	
<b>Complementos nutricionales</b>	Total	20 (62.5%)	
	Jóvenes	7 (70.0%)	
	Mediana edad	10 (71.4%)	0.241
	Seniors	3 (37.5%)	

Los valores son presentados con media y Desviación Estándar \*p<0,005 vs Jóvenes y mediana edad.

## 4.2 Evolutivo Variables Antropométricas Pre-Post Carrera

Se muestran a continuación la evolución de los valores antropométricos a lo largo de la carrera tanto por sexo, como por grupos de edad.

### 4.2.1 Evolutivo Variables Antropométricas Pre-Post Carrera por Sexo

En la tabla 4 se reflejan los valores en la salida y meta de ambos sexos, hallando en los hombres cambios estadísticamente significativos en el Peso, el IMC y el % de masa magra. Para las mujeres, estos cambios significativos solo se observan en el IMC y el % de masa magra. En el análisis intragrupos encontramos múltiples diferencias significativas (Peso, IMC, % masa magra y masa grasa) entre ambos sexos, tanto en precarrera como en meta.

**TABLA 3 EVOLUTIVO VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS PRE-POST CARRERA POR SEXO.**

<b>Variable</b>	<b>Sexo</b>	<b>Pre-carrera</b>	<b>Meta</b>	<b>P/ d Cohen Pre/post Carrera</b>
<b>Peso (Kg)</b>	Hombres	73.1 ± 6.4	71.4 ± 6.2	<0.001 / 1.305
	Mujeres	55.7 ± 5.1*	55.6 ± 5.4*	0.467
<b>IMC</b>	Hombres	23.5 ± 1.6	23.2 ± 1.5	<0.002/ 0.435
	Mujeres	21.7 ± 2.0*	21.6 ± 2.2*	0.523
<b>% Masa</b>	Hombres	87.7 ± 3.3	82.7 ±	<0.001 / 1.584
<b>Magra</b>	Mujeres	79.1 ± 4.3*	79 ± 5.56*	0.649
<b>% Masa</b>	Hombres	12.4 ± 3.1	12.6 ± 4.2	0.324
<b>Grasa</b>	Mujeres	20.9 ± 5.6*	21.5 ± 5.8*	0.220

Los valores son presentados con media y Desviación Estándar. \*p < 0.05 vs Hombres

#### 4.2.2 Evolutivo Variables Antropométricas Pre-Post Carrera por Grupos de Edad

En la Tabla 5, se reflejan las diferencias entre la salida y la meta para los grupos de jóvenes, mediana edad y seniors. Encontramos diferencias significativas en todos los grupos de edad, exceptuando para la variable Peso e IMV en el grupo de jóvenes. Igualmente, el único grupo etario que presenta modificaciones en el porcentaje de masa grasa es el grupo de seniors, que paradójicamente finalizaron la prueba con un % mayor de masa grasa, relacionado con la importante pérdida de masa magra. No encontramos diferencias significativas intragrupos en ninguna variable y en ningún momento del seguimiento durante la prueba atlética.

**TABLA 4 EVOLUTIVO VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS PRE-POST CARRERA POR GRUPOS DE EDAD.**

<b>Variable</b>	<b>Grupos edad</b>	<b>Pre-carrera (± DesvEst)</b>	<b>Meta (± DesvEst)</b>	<b>p / d-Cohen</b>
<b>Peso (Kg)</b>	Jóvenes	68.4 (± 9.1)	67.7 (± 8.4)	0.089
	Mediana edad	63.1 (± 8.8)	61.8 (± 8)	<0.001 / 1,45
	Seniors	68.4 (± 14.3)	67.2 (± 13.2)	< 0.001 / 1.57
<b>IMC</b>	Jóvenes	23.2 (± 1.2)	23.0 (± 1.2)	0.137
	Mediana edad	22.3 (± 1.8)	21.8 (± 1.6)	0.003 / 0.50
	Seniors	23.8 (± 3.0)	23.5 (± 2.8)	0.043 / 0.50
<b>% Masa magra</b>	Jóvenes	81.8 (± 4.4)	85.7 (± 5.8)	<0.001 / 2.25
	Mediana edad	81.0 (± 4.0)	85.1 (± 4.3)	<0.001 / 2.067
	Seniors	77.4 (± 5.7)	80.5 (± 7.6)	0.004 / 2.445
<b>% Masa grasa</b>	Jóvenes	14.3 (± 5.8)	14.9 (± 6.0)	0.139
	Mediana edad	14.9 (± 4.3)	14.6 (± 5.8)	0.387
	Seniors	19.5 (± 7.6)	20.7 (± 7)	0.019 / 1.278

Los valores son presentados con media y Desviación Estándar. \*p < 0.05 vs Mediana edad y Seniors.

### 4.3 Variables evolutivas de fuerza, Daño muscular, inflamación y recuperación Post-carrera

En la tabla 6 se muestra el evolutivo intracarrera de las variables relacionadas con la fuerza en tren superior y tren inferior, y las variables enzimáticas relacionadas con el daño muscular, la inflamación pre y postcarrera, y la recuperación a las 24 y 48 horas.

En relación a la fuerza, únicamente encontramos diferencias significativas en los pares musculares relacionados con el tren inferior y medidos a través de la plataforma de salto (SJ).

En las variables relacionadas con el daño y la inflamación muscular, hallamos importantes cambios con múltiples diferencias significativas tanto en meta, a las 24 y 48 horas, recogidas en la tabla nº6.

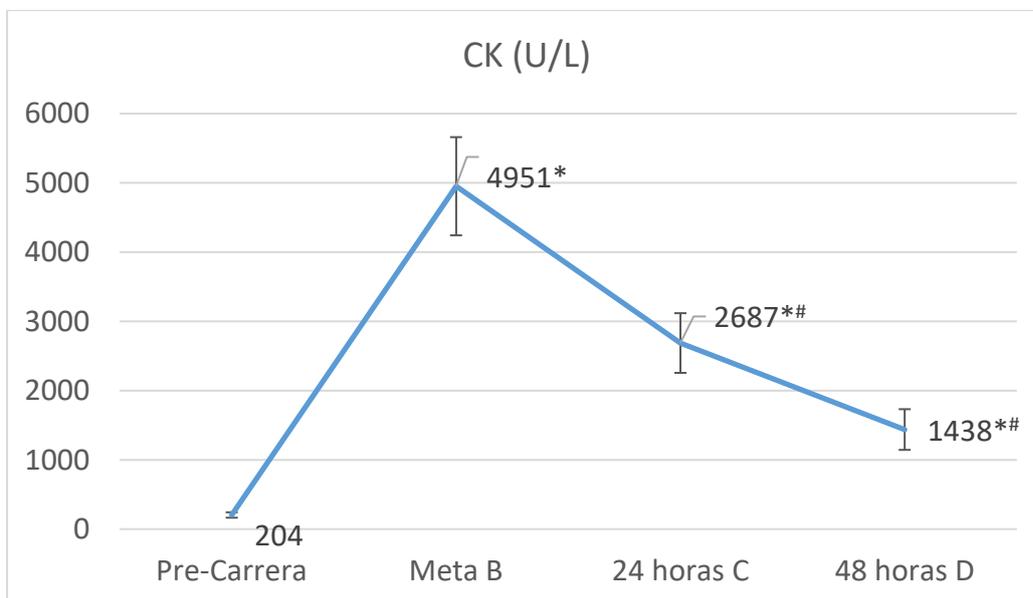
**TABLA 5 VARIABLES DE HG Y SJ DE AMBOS SEXOS, EN PRECARRERA Y EN LA META. ENZIMAS MARCADORES DE LA INFLAMACIÓN CK, LDH Y PCR**

<b>Variable</b>		<b>Media (±DesvEst)</b>	<b>p punto anterior / d-Cohen</b>
<b>Hand Grip (Kg)</b>	Pre-carrera	42 (± 2)	0.278
	Meta	41 (± 2)	
<b>Squat Jump (cm)</b>	Pre-carrera	24 (± 1)	<0.001/ 5.25*
	Meta	18 (± 1)	
<b>CK (U/L)</b>	Pre-carrera	204 (± 39)	<0.001 / 0.79* <0.001 / 1.25*# <0.001 / 0.76*#
	Meta	4951(± 709)	
	24 horas	2687 (± 431)	
	48 horas	1438 (± 294)	
<b>LDH (UI/L)</b>	Pre-carrera	189 (± 6)	<0.001 / 48.7* <0.001 / 40*# 0.085 / 107#
	Meta	373 (± 20)	
	24 horas	322 (± 20)	
	48 horas	312 (± 22)	

PCR (mg/DL)	Pre-carrera	0.16 ( $\pm$ 0.08)	
	Meta	2.0 ( $\pm$ 0.2)	<0.001 / 1.88*
	24 horas	3.8 ( $\pm$ 0.4)	<0.001 / 1.30*#
	48 horas	1.9 ( $\pm$ 0.2)	<0.001 / 1.13*#

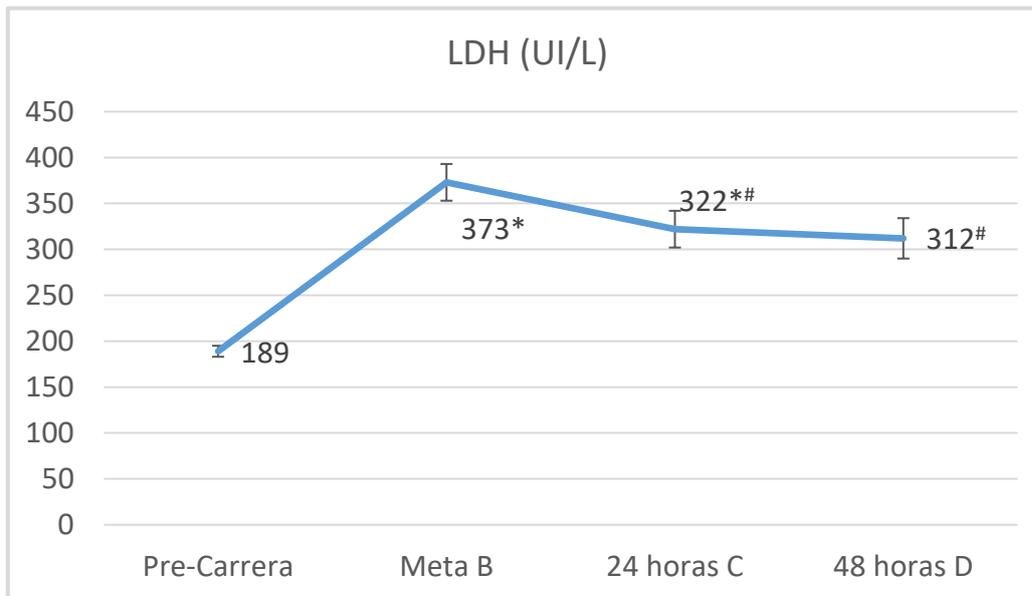
Los valores son presentados con media y Desviación Estándar. \*p < 0.05 con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera.

La evolución de las variables CK, LDH y PCR para la totalidad de la muestra puede observarse gráficamente en las figuras 9, 10 y 11.



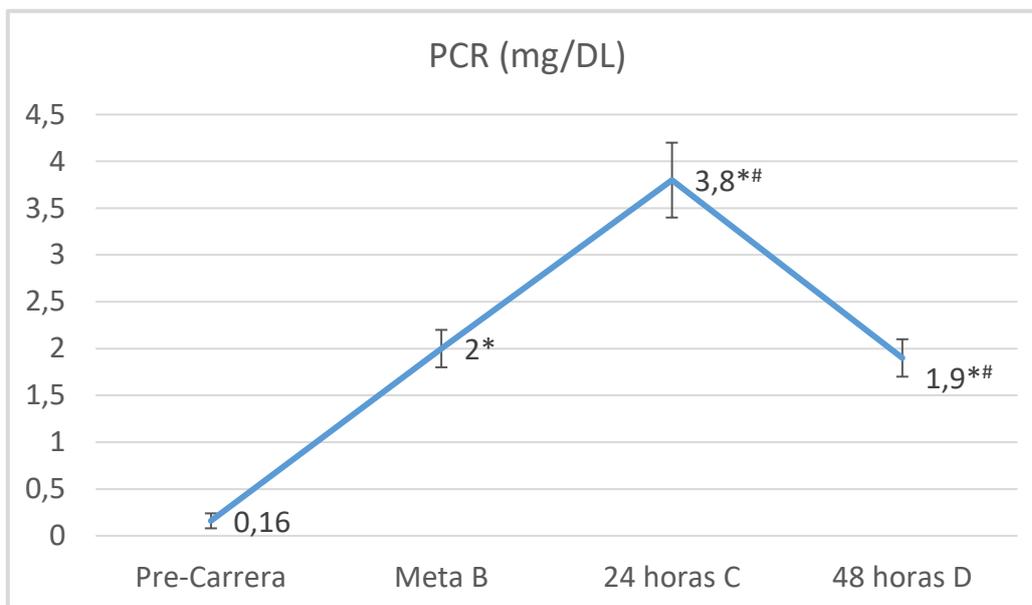
**FIGURA 10 EVOLUCIÓN TEMPORAL DE CK (U/L) PARA AMBOS**

Figura 10. Evolución temporal de CK (U/L) para ambos sexos, para los puntos A (Pre-Carrera), B Meta, C a las 24horas y D a las 48 horas. Los valores son presentados con media y barra de desviación Estándar. \*p < 0.05 con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera.



**FIGURA 11 EVOLUCIÓN TEMPORAL PARA AMBOS SEXOS**

Figura 11. Evolución temporal de LDH (U/L) para ambos sexos, para los puntos A (Pre-Carrera), B Meta, C a las 24horas y D a las 48 horas. Los valores son presentados con media y barra de desviación Estándar. \* $p < 0.05$  con el punto anterior; #  $p < 0.05$  con los valores Pre-carrera.



**FIGURA 12 EVOLUCIÓN TEMPORAL DE PCR PARA AMBOS SEXOS**

Figura 12. Evolución temporal de PCR (mg/DL) para ambos sexos, para los puntos A (Pre-Carrera), B Meta, C a las 24horas y D a las 48 horas. Los valores son presentados con media y barra de desviación Estándar. \*p < 0.05 con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera.

#### 4.3.1 Variables de fuerza, daño muscular, inflamación y recuperación post-carrera por sexo

En la tabla 7 se muestra el análisis evolutivo de la prueba atlética, dividido por sexos de las variables relacionadas con la fuerza (pre-post carrera), y las variables enzimáticas relacionadas con el daño muscular, la inflamación (pre-postcarrera, y 24 y 48 horas posteriores).

Igualmente se realiza un análisis intergrupos para analizar las diferencias entre ambos sexos para cada una de las variables y en cada momento de la prueba y la recuperación posterior.

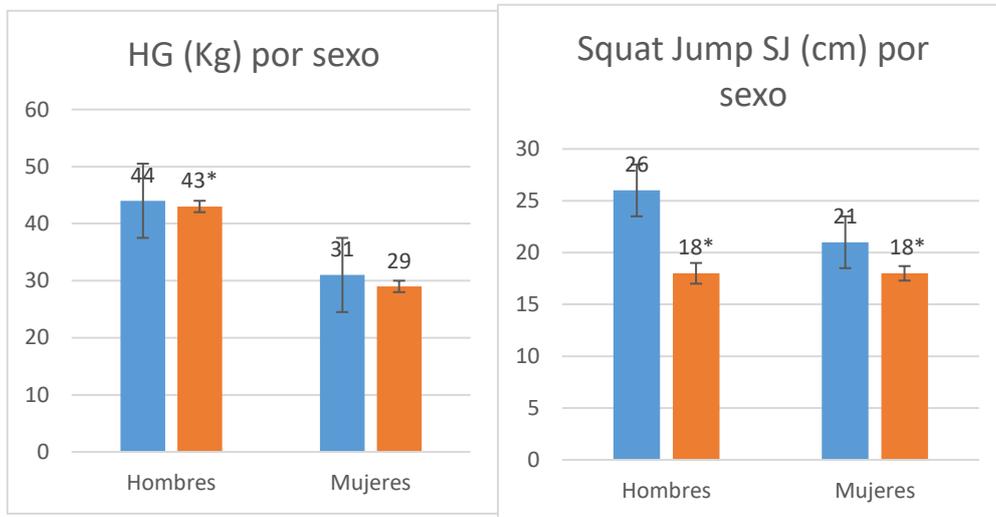
Encontramos cambios estadísticamente significativos en todas las variables analizadas y en distintos momentos del estudio que son recogidos en la tabla.

**TABLA 6 VARIABLES DE FUERZA, DAÑO MUSCULAR, INFLAMACIÓN Y RECUPERACIÓN POST-CARRERA POR SEXO**

<b>Variable</b>	<b>Sexo</b>	<b>Pre-carrera (±DesvEst)</b>	<b>Meta (±DesvEst)</b>	<b>24 horas (±DesvEst)</b>	<b>48 horas (±DesvEst)</b>
<b>Hand Grip (Kg)</b>	Hombres	48.8 (± 5.5)	49.4 (±6.9)		
	Mujeres	31 (± 2.4) <sup>1</sup>	28.7 (±4)*, <sup>1</sup>		
<b>Squat jump (cm)</b>	Hombres	26 (± 1)	18 (±1)*		
	Mujeres	21 (± 0.7) <sup>1</sup>	18 (± 0.7)*		
<b>CK (U/L)</b>	Hombres	252 (± 63)	4868 (±957)*	3114 (±668) * <sup>#</sup>	1803 (±472) * <sup>#</sup>
	Mujeres	133 (± 15)	5074 (±1091)*	2064 (± 385) * <sup>#</sup>	905 (± 148)* <sup>#</sup>
<b>LDH (UI/L)</b>	Hombres	191 (± 8)	370 (±25)*	323 (±29)* <sup>#</sup>	318 (±34) <sup>#</sup>
	Mujeres	187 (± 6)	379 (±33)*	321 (±26)* <sup>#</sup>	303 (±24)* <sup>#</sup>
<b>PCR (mg/DL)</b>	Hombres	0.08 (± 0.10)	2.0 (±0.3)*	4.0 (±0.6)* <sup>#</sup>	2.0 (±0.3)* <sup>#</sup>
	Mujeres	0.3 (± 0.2)	2.1 (±0.4)*	3.5 (±0.6)* <sup>#</sup>	1.8 (±0.3)* <sup>#</sup>

Los valores son presentados con media y Desviación Estándar. \*p < 0.05 con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera. <sup>1</sup> p < 0.05 vs Hombres.

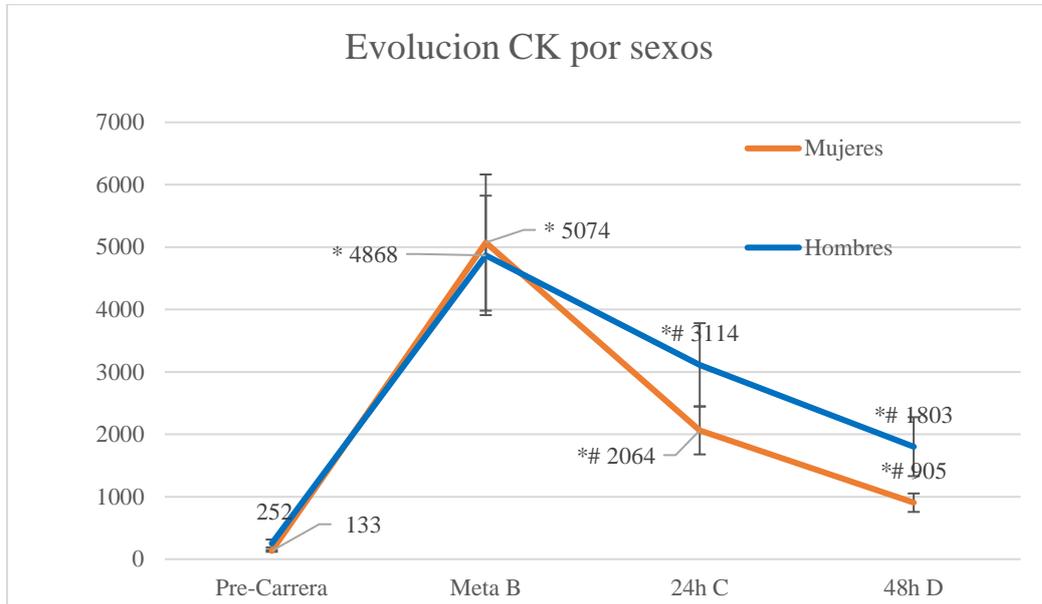
La figura 13 representa la evolución de las variables de fuerza medidas a través de HG y SJ, separada por sexos.



**FIGURA 13 DIFERENCIAS DE VARIABLES HG Y SJ POR SEXO**

Figura 13. Diferencias para las variables HG y SJ en precarrera (barra color azul) y meta (barra color rojo) por sexos. \*  $p < 0.05$  entre las determinaciones de meta y precarrera.

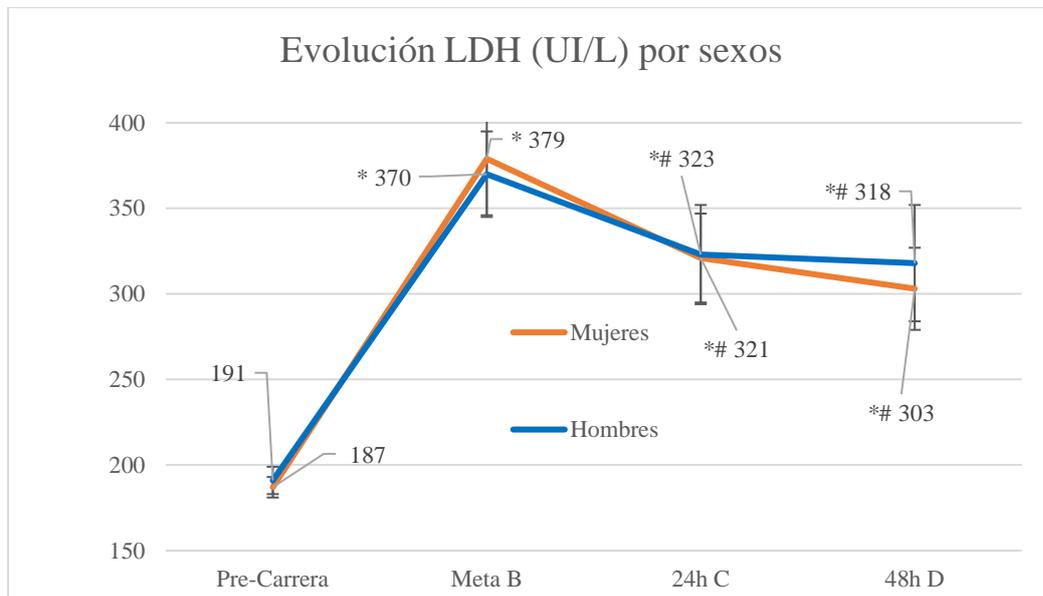
La evolución de las variables CK, LDH y PCR para cada uno de los sexos e la muestra puede observarse gráficamente en las figuras 13,14 y 15.



**FIGURA 14 EVOLUCIÓN TEMPORAL DE CK**

Figura 14. Evolución temporal de CK (U/L) por sexos. Puntos Pre-Carrera, Meta, 24horas y 48 horas. Los puntos #  $p < 0.05$  con el punto anterior y con respecto a los valores basales \* $p < 0.05$ .

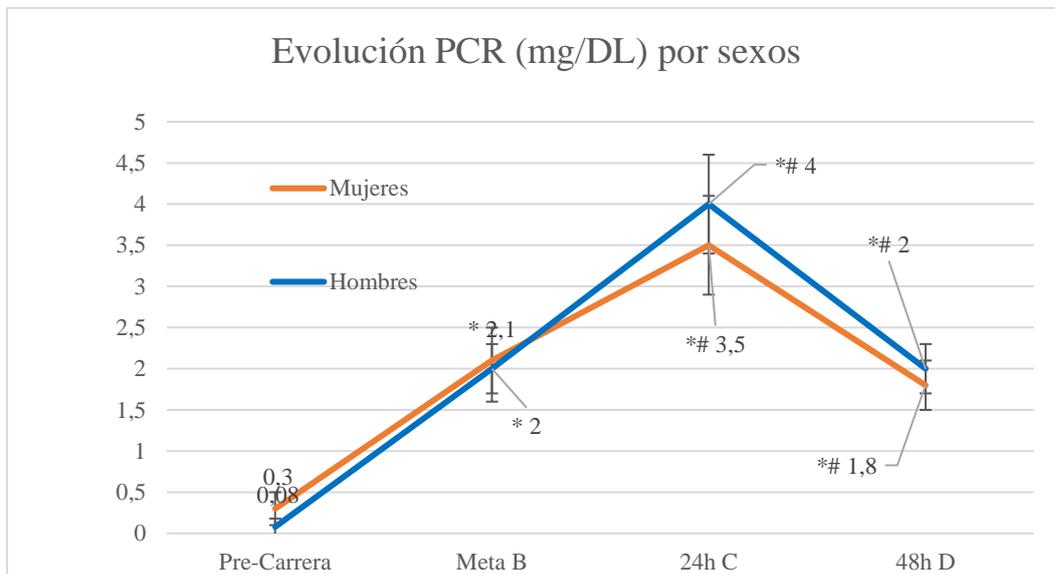
En la figura 15, se observa la evolución de LDH siendo parecidas entre ambos sexos.



**FIGURA 15 EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LDH**

Figura 15. Evolución de LDH (U/L) por sexos. Puntos Pre-Carrera, B Meta, C a las 24horas y D a las 48 horas. Los puntos #  $p < 0.05$  con el punto anterior y con respecto a los valores basales \* $p < 0.05$ .

En la figura 16, los 2 sexos alcanzan el máximo tras la 24h de finalizar la prueba y tiene un comportamiento muy similar entre los sexos.



**FIGURA 16 EVOLUCIÓN TEMPORAL DE PC POR SEXOS**

Figura 16. Evolución de PCR (mg/DL) por sexos. Puntos Pre-Carrera, B Meta, C a las 24horas y D a las 48 horas. Los puntos #  $p < 0.05$  con el punto anterior y con respecto a los valores basales \* $p < 0.05$ .

### 4.3.2 Variables de fuerza, daño muscular, inflamación y recuperación Post-carrera por grupos de edad

En la tabla 8 se muestra el evolutivo intracarrera, dividido por grupos etarios de las variables relacionadas con la fuerza, y las variables enzimáticas relacionadas con el daño muscular, la inflamación pre y postcarrera, y la recuperación a las 24 y 48 horas. A destacar que las concentraciones de CK estuvieron elevadas basalmente en el grupo de corredores más jóvenes. En esta tabla se puede observar las diferencias de recuperación en relación con los grupos de edad. El resto de enzimas de la inflamación muestran valores o comportamientos muy similares, siendo la concentración de LDH máxima en la Meta y disminuyendo hasta las 48h de la llegada. En cuanto a la PCR, el pico máximo se produjo para los 3 grupos a las 24h de la Meta.

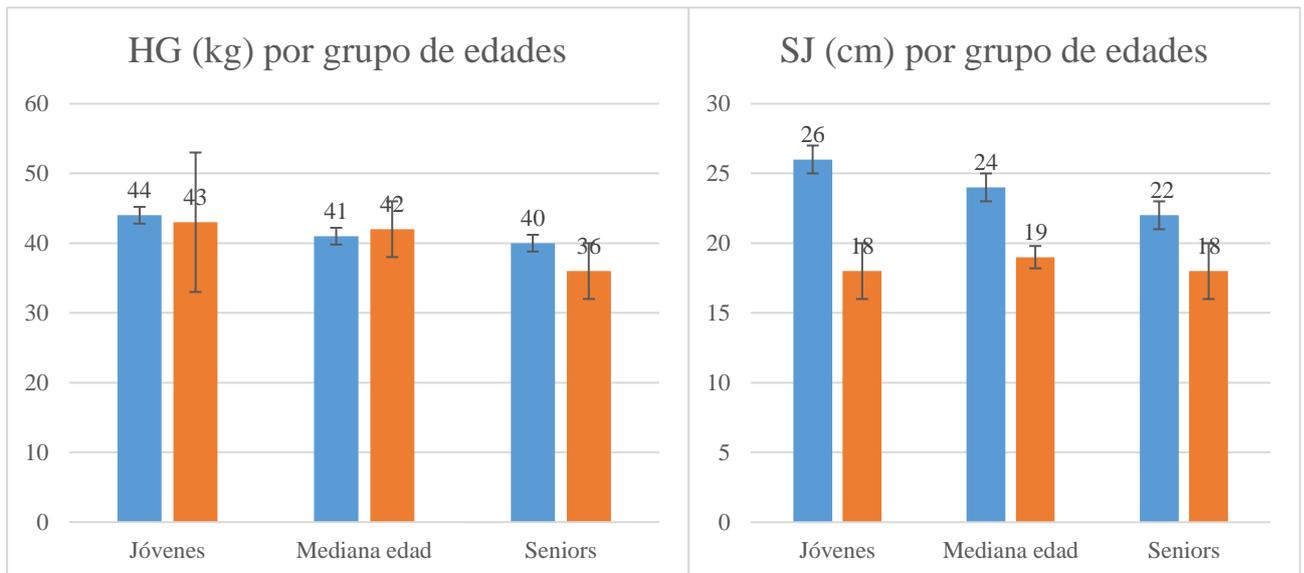
**TABLA 7 VARIABLES DE FUERZA, DAÑO MUSCULAR, INFLAMACIÓN Y RECUPERACIÓN POSTCARRERA POR GRUPOS DE EDAD.**

<b>Variable</b>	<b>Grupos edad</b>	<b>Pre-carrera (±DesvEst)</b>	<b>Meta (±DesvEst)</b>	<b>24 horas (±DesvEst)</b>	<b>48 horas (±DesvEst)</b>
<b>Hand Grip (Kg)</b>	Jóvenes	44 (± 8)	43 (± 10)		
	Mediana edad	41 (± 3)	42 (±4)		
	Seniors	40 (± 4)	36 (± 4)		
<b>Squat jump (cm)</b>	Jóvenes	26 (± 1)	18 (± 2)		
	Mediana edad	24 (± 1)	19 (± 0.8)		
	Seniors	22 (± 1)	18 (± 2)		
<b>CK (U/L)</b>	Jóvenes	295 (±115)	3613 (± 645*) <sup>1</sup>	1550 (± 357* <sup>#</sup> )	783 (± 219* <sup>#</sup> )
	Mediana edad	181 (±30)	4522 (±1021*)	3204 (±510 <sup>#</sup> )	1910 (± 610* <sup>#</sup> )
	Seniors	129 (± 14)	7376 (±1910*)	3204 (±787* <sup>#</sup> )	1433 (± 337* <sup>#</sup> )
<b>LDH (UI/L)</b>	Jóvenes	184 (± 11)	335 (± 22*)	259 (± 23* <sup>#</sup> ) <sup>1</sup>	249 (± 21* <sup>#</sup> )
	Mediana edad	193 (± 8)	368 (± 34*)	347 (± 36 <sup>#</sup> )	351 (± 43 <sup>#</sup> )
	Seniors	190 (±10)	431 (± 39*)	357 (± 31* <sup>#</sup> )	324 (± 31* <sup>#</sup> )
	Jóvenes	0.11 (± 0.04)	2.0 (± 0.4*)	3.6 (± 0.9* <sup>#</sup> )	1.8 (± 0.4* <sup>#</sup> )

<b>PCR (mg/DL)</b>	Mediana edad	0.2 ( $\pm$ 0.2)	1.7 ( $\pm$ 0.3*)	3.9 ( $\pm$ 0.7*#)	1.9 ( $\pm$ 0.4*#)
	Seniors	0.10 ( $\pm$ 0.02)	2.5 ( $\pm$ 0.3*)	3.9 ( $\pm$ 0.7*#)	2.0 ( $\pm$ 0.4*#)

Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \*p<0.05 Con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera. <sup>11</sup> p < 0.05 vs Seniors.

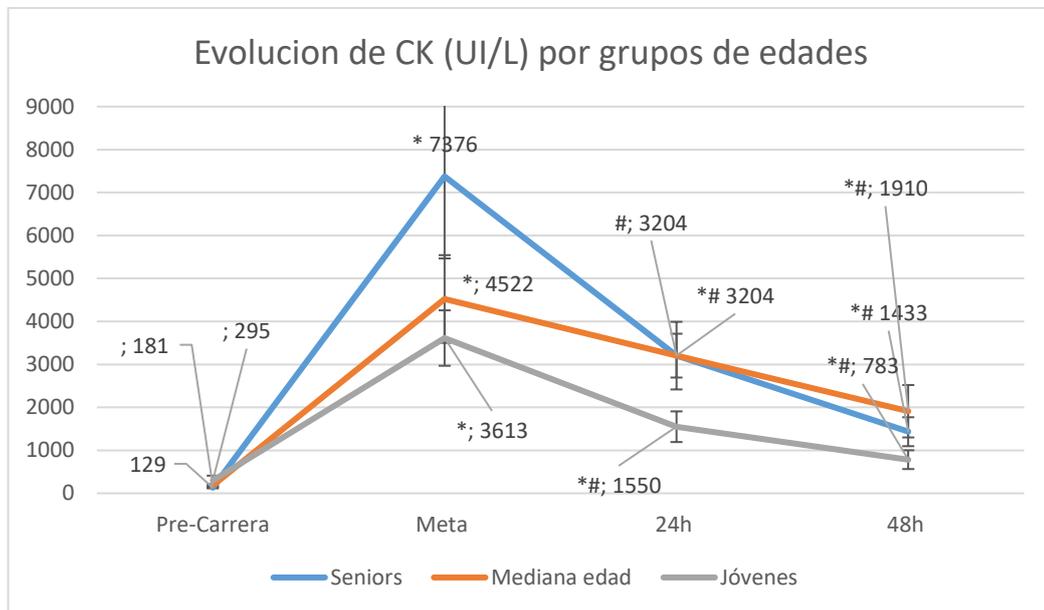
La figura 17 representa la evolución de las variables de fuerza medidas a través de HG y SJ, separada por grupos de edad.



**FIGURA 17 REPRESENTACIÓN DE HG Y SJ POR EDADES**

Figura 17. Representación de la fuerza en Kg en HG y cm (SJ) entre precarrera (barra color azul) y meta (barra color rojo) por grupos edad. \* p<0.05 entre las determinaciones de meta y precarrera.

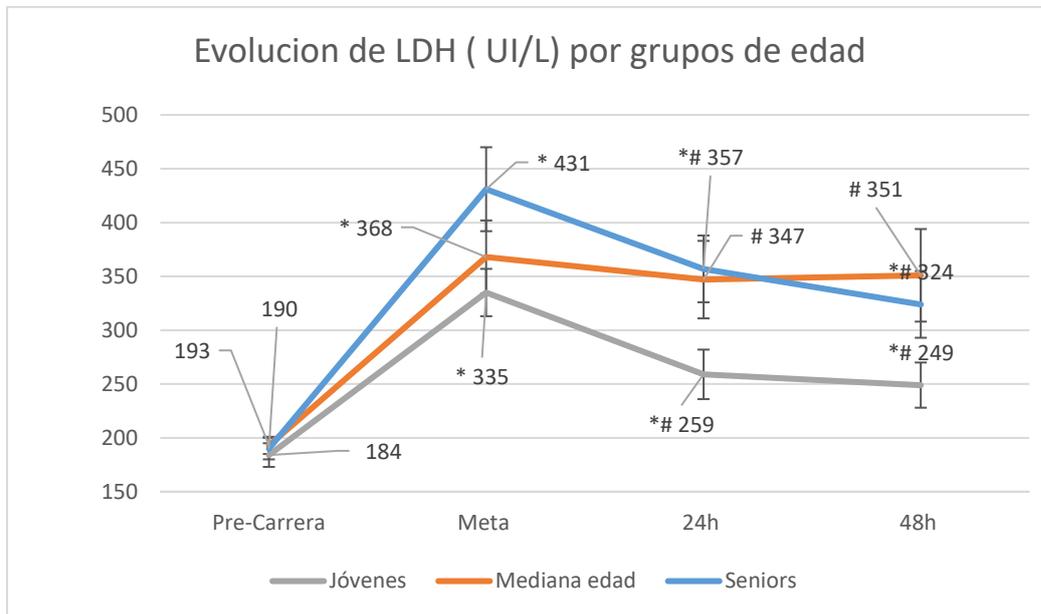
La evolución de las variables CK, LDH y PCR para cada grupo de edad de la muestra puede observarse gráficamente en las figuras 18, 19 y 20.



**FIGURA 18 EVOLUCIÓN DE CK POR EDADES**

Figura 18. Representación de la evolución temporal de CK (U/L) con barra de errores de desviación estándar para los distintos grupos etarios. Puntos: Pre-Carrera, Meta, a las 24 horas y a las 48 horas. Los puntos #  $p < 0.05$  con el punto anterior y con respecto a los valores basales \* $p < 0.05$ .

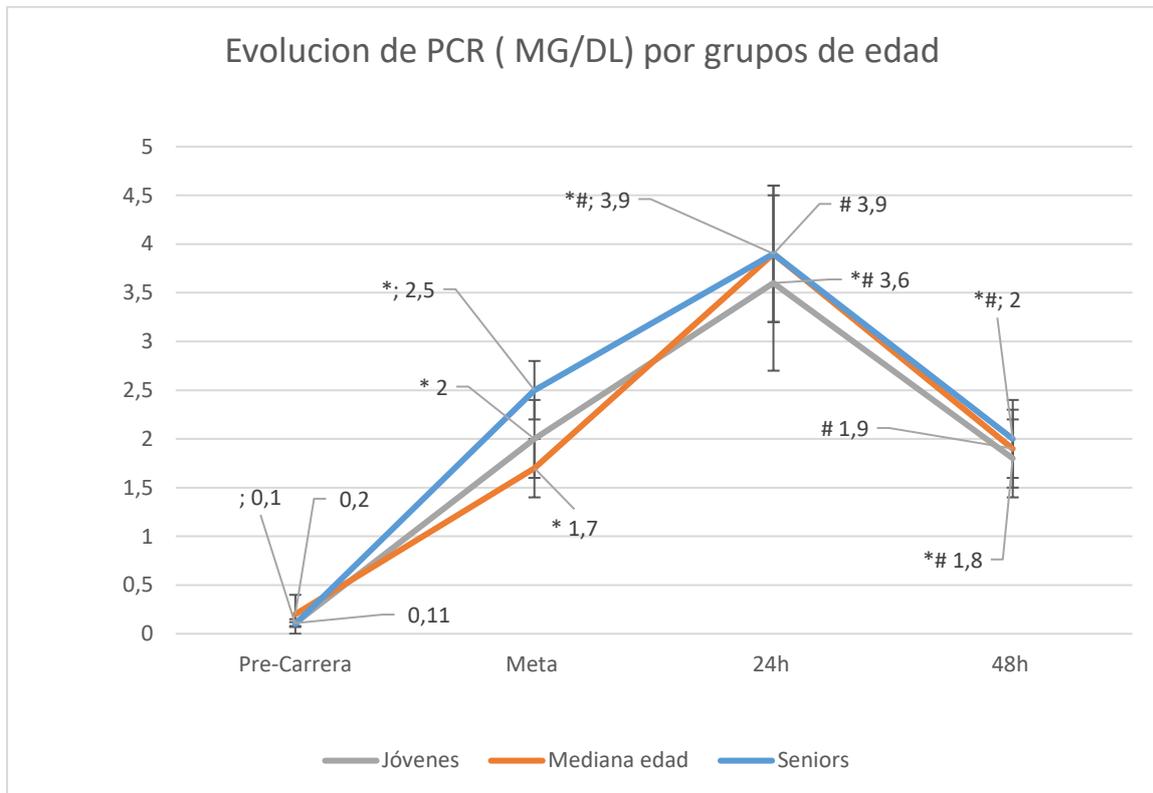
La figura 19 representa la evolución de LDH de los tres grupos de edad alcanzando el máximo en la meta.



**FIGURA 19 EVOLUCIÓN DE LDH POR EDADES**

Figura 19. Evolución temporal de LDH (U/L) con barra de errores de desviación estándar para los distintos grupos etarios. Puntos Pre-Carrera, Meta, a las 24horas y a las 48 horas. Los puntos #  $p < 0.05$  con el punto anterior y con respecto a los valores basales \* $p < 0.05$ .

En la Figura 20, se puede ver como la PCR alcanza el máximo tras la 24h, en todos los grupos de edad, con similitud en todos los grupos.



**FIGURA 20 EVOLUCIÓN DE PCR POR GRUPOS DE EDADES**

Figura 20. Eevolución temporal de PCR (mg/dL) con barra de errores de desviación estándar. Puntos A (Pre-Carrera), B Meta, C a las 24horas y D a las 48 horas. Los puntos #  $p < 0.05$  con el punto anterior y con respecto a los valores basales \* $p < 0.05$ .

#### 4.4 Variables de estrés oxidativo

En la tabla nº 9 se presenta la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR, así como la concentración de los marcadores de daño oxidativo a lípidos (MDA) y proteínas (GC) analizados en pre-carrera, Meta y tras 24 y 48 horas. Se observan cambios significativos en todas las variables con excepción de la actividad GPx. La actividad de la GR se vió incrementada al finalizar la carrera y tras 24h de la misma, recuperando los valores iniciales transcurridas 48 horas desde el evento. La concentración MDA y GC aumentó significativamente en meta, sin embargo, la concentración de MDA fluctuó temporalmente a las 24 horas para volver a incrementarse a las 48h. El contenido de GC en cambio, se mantuvo elevado durante los dos días posteriores a la carrera. Por lo tanto, no se observa una recuperación, en términos de daño oxidativo a lípidos y proteínas, transcurridas 48 horas desde el evento.

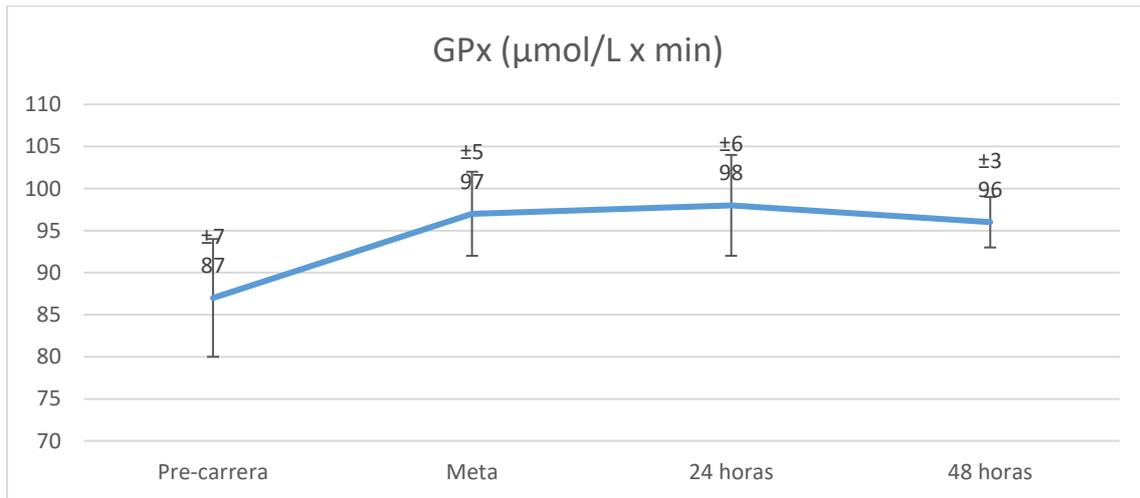
**TABLA 8 VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO.**

<b>Variable</b>	<b>Media (±DE)</b>	
<b>GPx (μmol/L x min)</b>	Pre-carrera	87(± 7)
	Meta	97(± 5)
	24 horas	98 ± 6)
	48 horas	96 (± 3)
<b>GR (UI/mL)</b>	Pre-carrera	2.6 (± 0.1)
	Meta	3.3 (±0.2 <sup>#</sup> )
	24 horas	7.3 (± 0.5* <sup>#</sup> )
	48 horas	2.6 (± 0.1*)
<b>MDA (μM )</b>	Pre-carrera	(0.8 ± 0.1)
	Meta	1.3 (± 0.1 <sup>#</sup> )
	24 horas	0.9 (± 0.1*)
	48 horas	1.4 (± 0.1* <sup>#</sup> )
<b>GC (nmol/mL)</b>	Pre-carrera	1.4 (± 0.1)
	Meta	2.2 (± 0.2 <sup>#</sup> )
	24 horas	1.9 (± 0.2 <sup>#</sup> )

48 horas	2.1 ( $\pm 0.3^{\#}$ )
----------	------------------------

Los valores se presentan con media y DE. \* $p < 0.05$  Con el punto anterior; #  $p < 0.05$  con los valores Pre-carrera

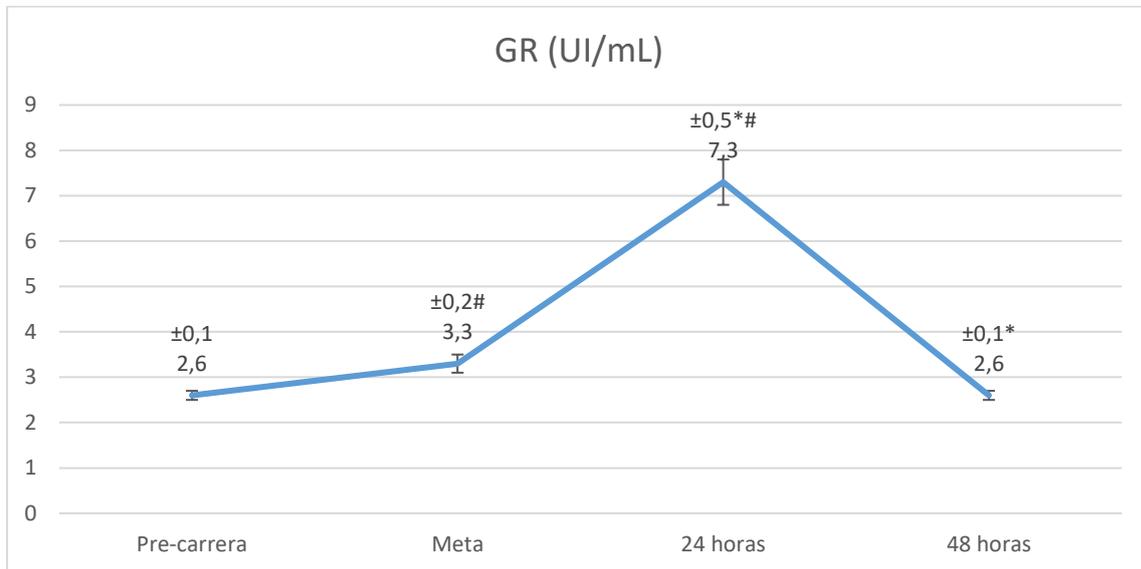
En la figura 21, se muestra la evolución de la actividad GPx, cuyos valores se vieron incrementados en meta y tras 24h, sin que lleguen a ser estadísticamente significativas.



**FIGURA 21 EVOLUCIÓN DE GPX**

Figura 21 Cambios en los marcadores plasmáticos del estado oxidativo a lo largo del estudio para la totalidad de los corredores. Actividad GPx (glutathion peroxidasa).

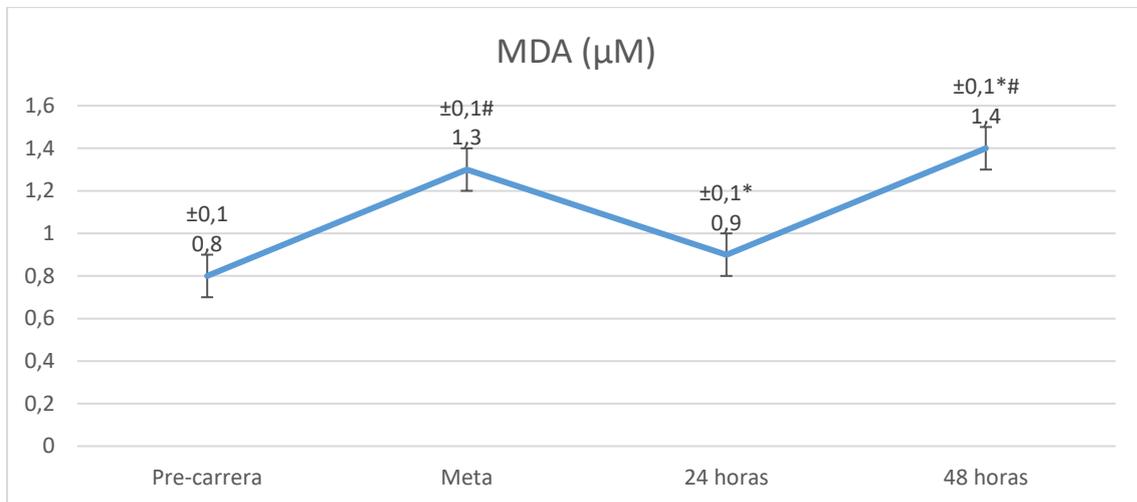
En la figura 22 se muestran los valores basales y evolutivos de recuperación post-carrera de la actividad GR, observándose un incremento significativo en meta y durante las 24 horas posteriores, normalizándose transcurridas 48 horas desde la carrera.



**FIGURA 22 EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD GR**

Figura 22. Actividad GR a lo largo del estudio. \*  $p < 0.05$  con el punto de extracción anterior y #  $p < 0.05$ , con respecto a los valores basales.

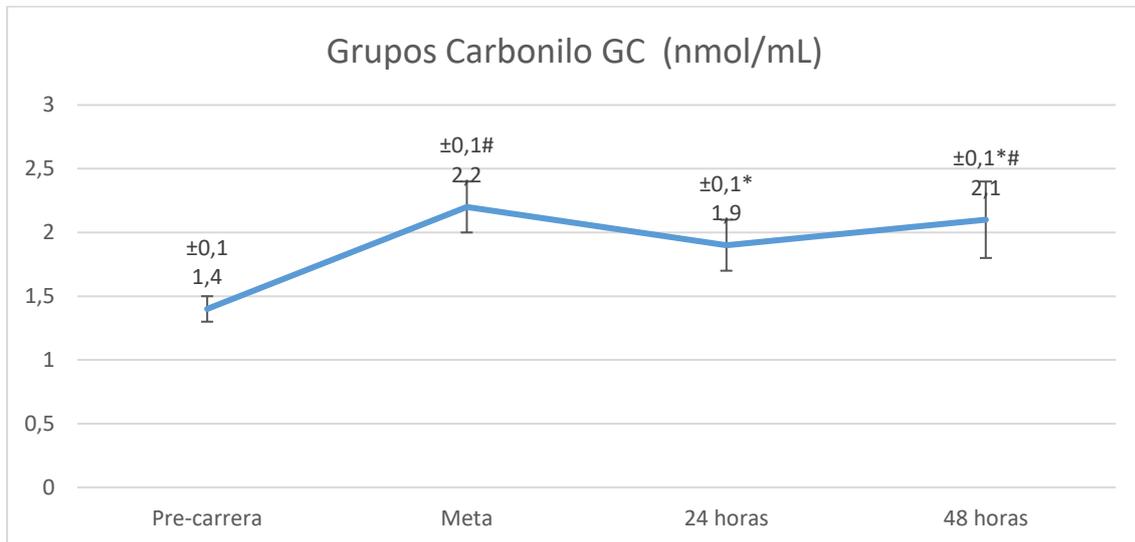
En la figura 23 se muestran los valores basales y evolutivos de recuperación postcarrera de la concentración de MDA, observándose un incremento significativo de la misma en meta y transcurridas 48 horas desde el evento cuando se compara con los valores previos a la carrera.



**FIGURA 23 EVOLUCIÓN DE MDA**

Figura 23. Concentración de MDA a lo largo del estudio. \*  $p < 0.05$  con el punto de extracción anterior y #  $p < 0.05$ , con respecto a los valores basales.

En la figura 24 se muestran los valores basales y evolutivos de recuperación post-carrera del contenido en GC. Dicho parámetro incrementó significativamente en meta y se mantuvo elevado los dos días posteriores.



**FIGURA 24 EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO DE LOS GC**

Figura 24. Concentración de GC (nmol/mL). \*  $p < 0.05$  con el punto de extracción anterior y #  $p < 0.05$ , con respecto a los valores basales.

#### 4.4.1 Evolutivo de las variables de estrés oxidativo por sexo

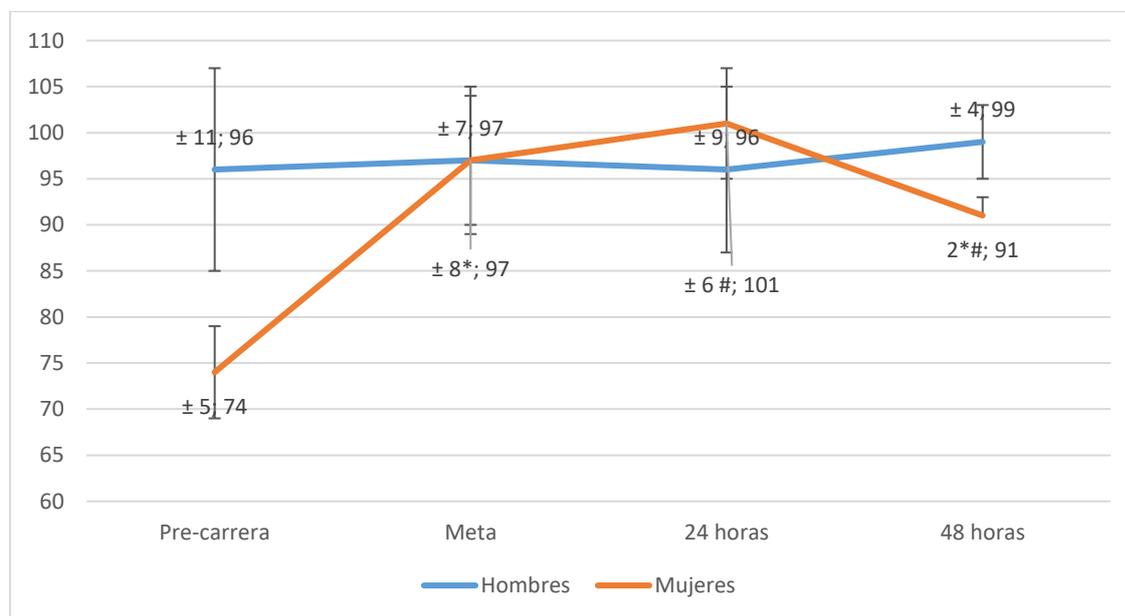
Se muestra a continuación en la tabla 10, la evolución de las variables de estado oxidativo en función del género. No se observaron diferencias en la evolución de la actividad de las enzimas antioxidantes. Sin embargo, se observan diferencias significativas en la concentración de MDA transcurridas 48 horas de la carrera entre hombres y mujeres. Igualmente existen diferencias significativas en la concentración de GC entre hombres y mujeres en la recuperación de la carrera, encontrando concentraciones mas elevadas en las mujeres.

**TABLA 9 VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO POR SEXO.**

Variable	Sexo	Pre-carrera	Meta	24 horas	48 horas
<b>GPx</b> ( $\mu\text{mol/Lxmin}$ )	Hombres	95.7 ( $\pm$ 9.1)	97.2 ( $\pm$ 7)	95.7 ( $\pm$ 7.3)	99.3 ( $\pm$ 3.4)
	Mujeres	73.9 ( $\pm$ 11.1)	97.4 ( $\pm$ 8*)	101.4 ( $\pm$ 8.8 #)	91.4 ( $\pm$ 4.1*#)
<b>GR (UI/mL)</b>	Hombres	2.6 ( $\pm$ 0.2)	3.2 ( $\pm$ 0.2*)	7.2 ( $\pm$ 0.6*#)	2.5 ( $\pm$ 0.2*)
	Mujeres	2.4 ( $\pm$ 0.2)	3.4 ( $\pm$ 0.3*)	7.5 ( $\pm$ 0.7 *#)	2.7 ( $\pm$ 0.1*)
<b>MDA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	Hombres	0.6 ( $\pm$ 0.1)	1.4 ( $\pm$ 0.2*)	0.9 ( $\pm$ 0.1*#)	1.6 $\pm$ (0.1*#)
	Mujeres	0.9 ( $\pm$ 0.2)	1.1 ( $\pm$ 0.2*)	0.7 ( $\pm$ 0.1*)	1.1 ( $\pm$ 0.1) <sup>1</sup>
<b>GC (nmol/mL)</b>	Hombres	1.5 ( $\pm$ 0.1)	1.7 ( $\pm$ 0.3)	1.7 ( $\pm$ 0.2)	1.4 ( $\pm$ 0.1)
	Mujeres	1.3 ( $\pm$ 0.1)	2.9 ( $\pm$ 0.4*) <sup>1</sup>	2.2 ( $\pm$ 0.2*#) <sup>1</sup>	2.5 ( $\pm$ 0.3#) <sup>1</sup>

Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \*p < 0.05 Con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera.<sup>1</sup> p < 0.05 vs Hombres.

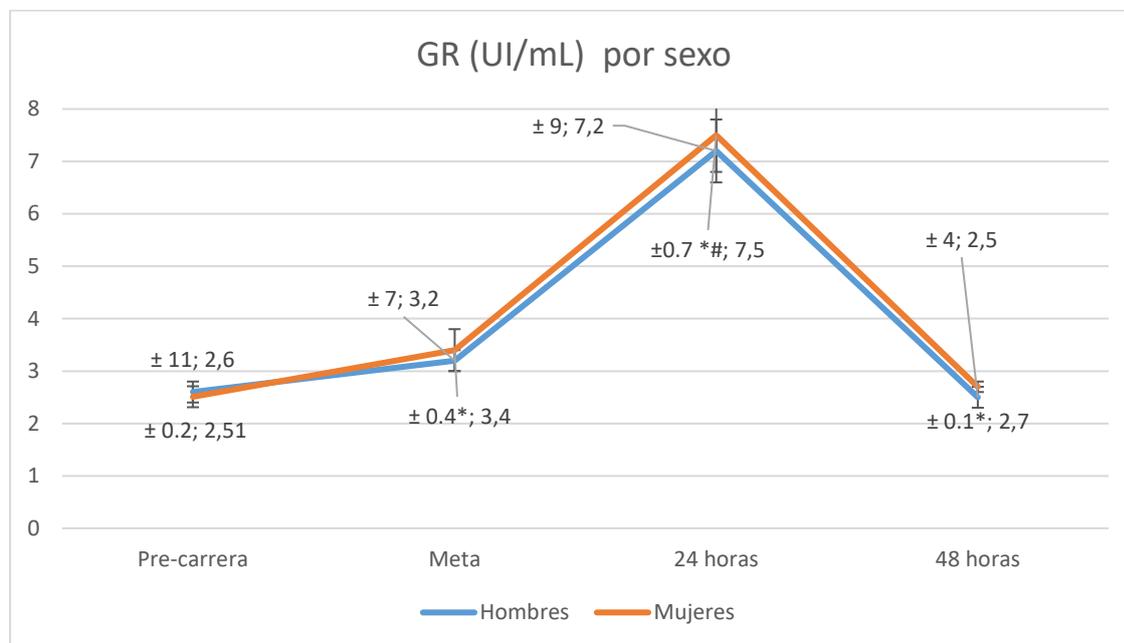
Los valores obtenidos por sexo para la actividad GPx ( $\mu\text{mol/L} \times \text{min}$ ) se recogen gráficamente en la figura n° 24, sin que se aprecien diferencias significativas.



**FIGURA 25 EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GPx POR SEXO**

Figura 25. Evolución de la actividad GPx ( $\mu\text{mol/L} \times \text{min}$ ) en función del género. Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \* $p < 0.05$  Con el punto anterior; #  $p < 0.05$  con los valores Pre-carrera.

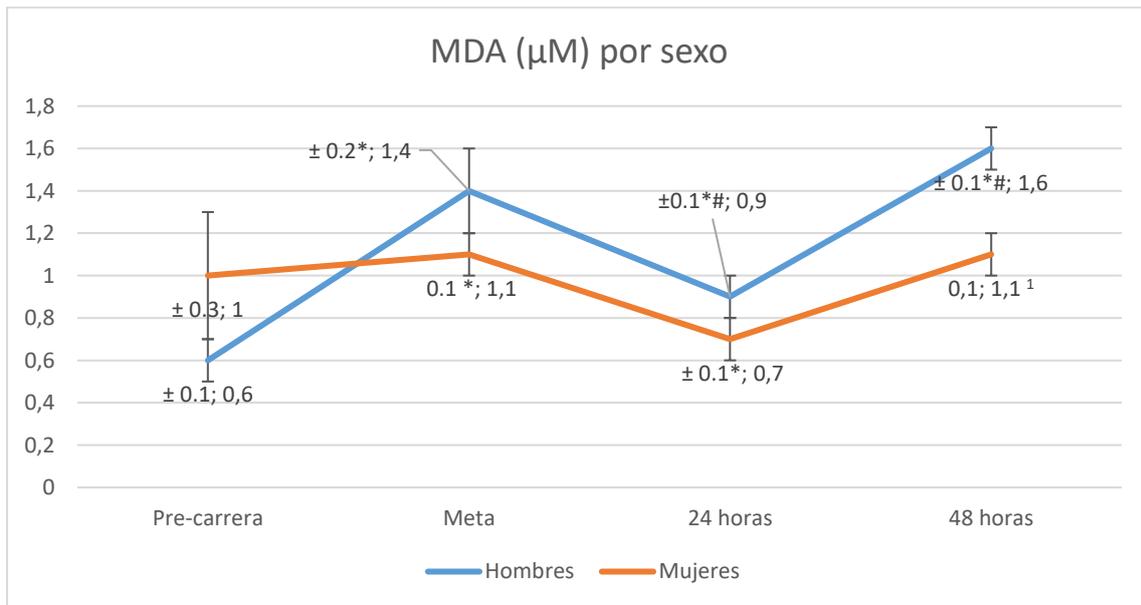
En la figura 26 se representan diferenciados por sexo los valores de actividad GR (UI/mL) obtenidos a lo largo del estudio. El comportamiento es muy similar en ambos sexos, marcando un máximo a las 24h después de la prueba.



**FIGURA 26 EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GR POR SEXO**

Figura 26. Evolución de la actividad GR (UI/mL) en función del género. Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \* $p < 0.05$  Con el punto anterior; #  $p < 0.05$  con los valores Pre-carrera.

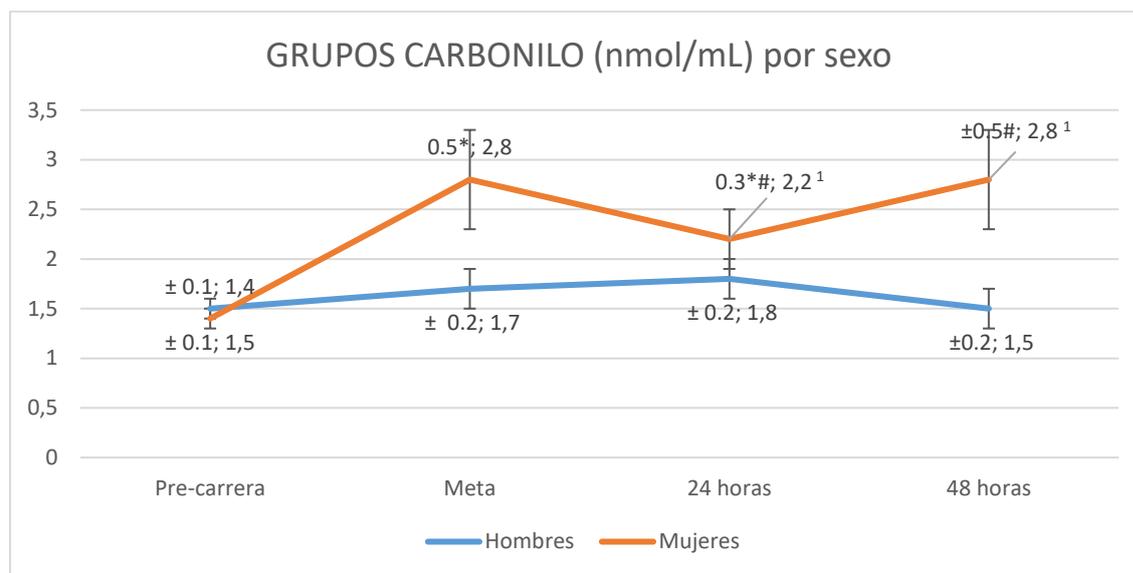
La evolución de la concentración de MDA ( $\mu\text{M}$ ) en función del sexo se recoge gráficamente en la figura nº 26. Se observan diferencias significativas transcurridas 48 horas desde el evento, siendo la concentración de MDA significativamente mas elevada en los hombres.



**FIGURA 27 EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MDA POR SEXO**

Figura 27. Evolución de la concentración de MDA por sexo. Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \* $p < 0.05$  Con el punto anterior; #  $p < 0.05$  con los valores Pre-carrera; <sup>1</sup>  $p < 0.05$  vs Hombres.

La figura 28 recoge el evolutivo de los valores obtenidos de contenido en GC (nmol/mL) en función del sexo. Se observa que el contenido en GC es significativamente más elevado en mujeres que en hombres en meta y transcurridas 24 y 48 horas desde la carrera.



**FIGURA 28 EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GC**

Figura 28. Evolución de la concentración de GC en función del sexo. Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \* $p < 0.05$  Con el punto anterior; #  $p < 0.05$  con los valores Pre-carrera. 1  $p < 0.05$  vs Hombres.

#### 4.4.2 Variables de carrera estrés oxidativo por grupos de edad.

En la tabla n°11 se muestra el evolutivo de las variables de estado oxidativo analizadas basalmente, pre-carrera y su evolutivo en meta, 24 y 48 horas, así como las diferencias intregupos en cada momento de las determinaciones. Así, se observa que la actividad GR basal es significativamente menor en los corredores senior. Se observa igualmente, que el contenido en GC en meta de los corredores senior fue significativamente menor que en el resto de grupos de edad.

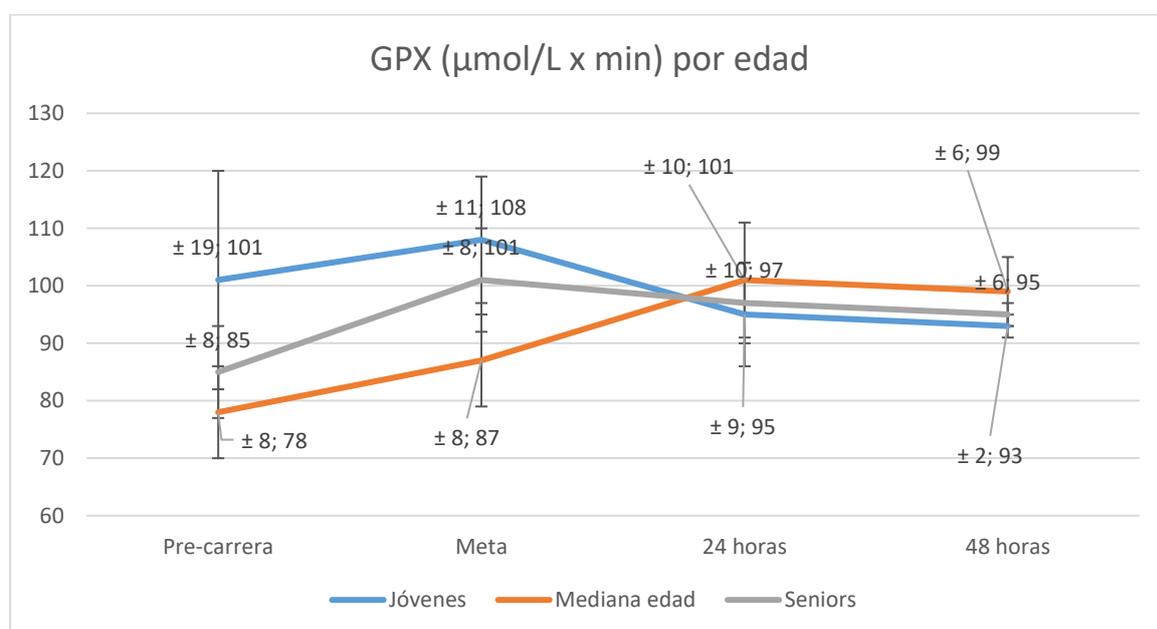
**TABLA 10 VARIABLES DE CARRERA DE ESTRÉS OXIDATIVO POR GRUPOS DE EDAD**

Variable	Grupos edad	Pre-carrera	Meta	24 horas	48 horas
<b>GPX</b> ( $\mu\text{mol/L} \times \text{min}$ )	Jóvenes	101 $\pm$ 19	108 $\pm$ 11	95 $\pm$ 9	93 $\pm$ 2
	Mediana edad	78 $\pm$ 8	87 $\pm$ 8	101 $\pm$ 10	99 $\pm$ 6
	Seniors	85 $\pm$ 8	101 $\pm$ 9	97 $\pm$ 7	95 $\pm$ 2
<b>GR (UI/mL)</b>	Jóvenes	3.0 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.9* <sup>#</sup>	2.5 $\pm$ 0.2* <sup>#</sup>
	Mediana edad	2.5 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.2*	7.6 $\pm$ 0.7* <sup>#</sup>	2.7 $\pm$ 0.2*
	Seniors	2.2 $\pm$ 0.3 <sup>1</sup>	3.2 $\pm$ 0.4*	6.4 $\pm$ 0.8* <sup>#</sup>	2.4 $\pm$ 0.1*
<b>MDA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	Jóvenes	0.7 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.4*	0.7 $\pm$ 0.1*	1.3 $\pm$ 0.2* <sup>#</sup>
	Mediana edad	0.7 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1*	1.3 $\pm$ 0.1* <sup>#</sup>
	Seniors	0.9 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2* <sup>#</sup>
<b>CARBONILO</b> ( $\text{nmol/mL}$ )	Jóvenes	1.4 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.6
	Mediana edad	1.3 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.5*	2.0 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.4 <sup>#</sup>
	Seniors	1.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.3 <sup>1</sup>	2.1 $\pm$ 0.3*	1.5 $\pm$ 0.4* <sup>#</sup>

Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \*p < 0.05 Con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera. <sup>1</sup> p < 0.05 Vs jóvenes y mediada edad.

La evolución de las variables actividad GPX, actividad GR, concentración de MDA y contenido en GC, así como las diferencias significativas para cada grupo de edad puede observarse gráficamente en las figuras nº 29, 30, 31 y 32.

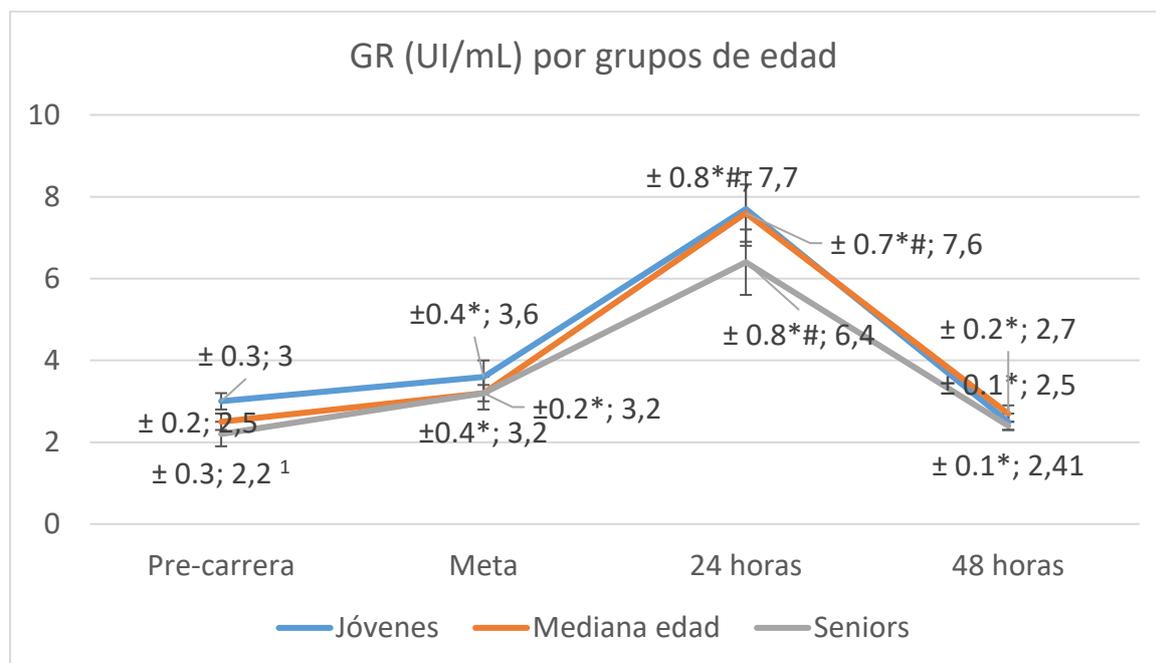
En relación a la actividad GPx no se observaron diferencias significativas en función del grupo etario.



**FIGURA 29 EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD GPX POR GRUPOS DE EDADES**

Figura 29. Evolución de la actividad GPx (µmol/L x min) por grupos de edad. Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \*p < 0.05 Con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera.

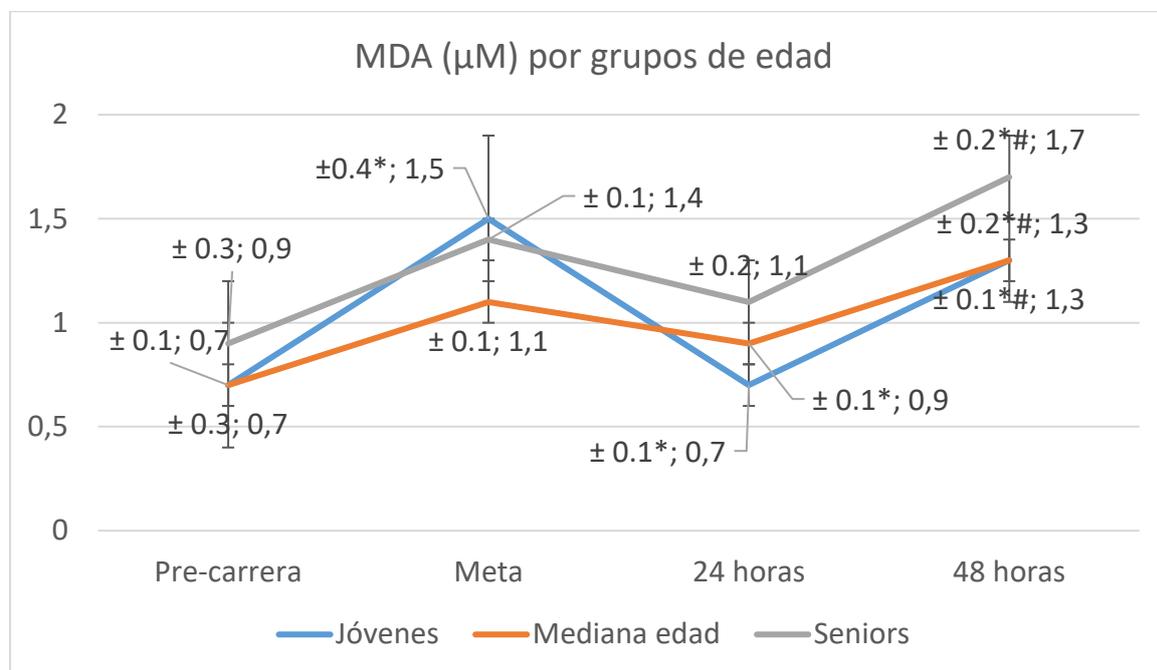
En la figura 30, se observa el máximo valor de GR, a las 24h y recuperando los valores basales a las 48h después de terminar la prueba. Se observa que los corredores senior presentan una menor actividad GR basal que el resto de corredores, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.



**FIGURA 30 EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD GR POR GRUPOS DE EDADES**

Figura 30. Evolución de la actividad GR en función de la edad. Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \* $p < 0.05$  Con el punto anterior; #  $p < 0.05$  con los valores Pre-carrera. 1  $p < 0.05$  Vs jóvenes y mediada edad.

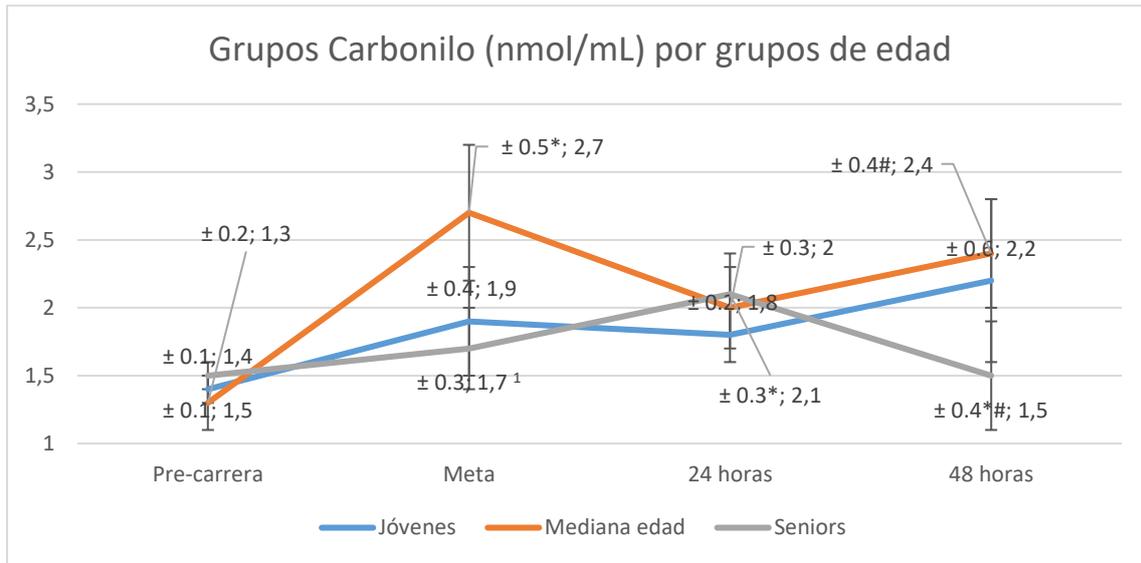
En la figura 31, se recoge la evolución de la concentración de MDA en función de la edad sin que se aprecien diferencias estadísticamente significativas.



**FIGURA 31 EVOLUCIÓN DE MDA POR GRUPOS DE EDADES**

Figura 31. Evolución de MDA (µM) Pre-carrera, Meta, 24 horas y 48 horas post-carrera. Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \*p<0.05 Con el punto anterior; # p < 0.05 con los valores Pre-carrera

La figura 32 recoge la evolución del contenido en GC en el plasma de los corredores según la franja de edad. Se observa que los corredores senior presentan un menos contenido en GC en meta cuando se comparan con el resto de corredores, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.



**FIGURA 32 EVOLUCION DE LA CONCENTRACIÓN DE GC POR GRUPOS DE EDADES**

Figura 32. Evolución del contenido en GC (nmol/mL) en función de la edad. Los valores son presentados con Media y Desviación Estándar. \* $p < 0.05$  Con el punto anterior; #  $p < 0.05$  con los valores Pre-carrera. 1  $p < 0.05$  Vs jóvenes y mediada edad.

## 4.5 Correlación entre los marcadores de estres oxidativo, fuerza, daño muscular y respuesta inflamatoria sistémica

La tabla 12 muestra la correlación entre los marcadores de estres oxidativo en el plasma de los corredores y los parámetros de daño muscular, inflamación y fatiga. Se ha indicado el  $r_{\text{valor}}$  en aquellas correlaciones estadísticamente significativas.

**TABLA 11 CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LA FUERZA DE PRODUCCIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO, DAÑO MUSCULAR Y RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA**

Correlaciones (p/r $r_{\text{valor}}$ )	GPx	GR	MDA	Carbonilo
$\Delta$ Hand Grip meta	0.60	0.17	0.032/-0.379	0.47
$\Delta$ Squat Jump meta	0.08	0.027/0.405	0.98	0.11
$\Delta$ CK meta	0.33	0.019/-0.411	0.50	0.10
$\Delta$ CK 24 horas	0.13	0.048/-0.352	0.99	0.48
$\Delta$ CK 48 horas	0.043/-0.360	0.071/-0.323	0.73	0.39
$\Delta$ LDH meta	0.18	0.023/-0.402	0.73	0.21
$\Delta$ LDH 24 horas	0.88	0.017/-0.418	0.17	0.048/0.358
$\Delta$ LDH 48 horas	0.77	0.021/-0.406	0.19	0.045/0.363
$\Delta$ PCR meta	0.29	0.53	0.75	0.97
$\Delta$ PCR 24 horas	0.75	0.93	0.61	0.96
$\Delta$ PCR 48 horas	0.88	0.89	0.72	0.94

Los valores que se muestran con  $r_{\text{valor}}$ , presentan una correlación significativa en nivel de 0.05 (bilateral).

## 4.6 Análisis de Regresión Múltiple.

Los resultados del análisis de regresión múltiple se enumeran en la Tabla 13. Al realizar el análisis de regresión lineal múltiple utilizando la edad y GR como variables predictivas, se obtuvo una ecuación de regresión significativa para la variable dependiente del valor delta de SJ. Este análisis indicaría que el grupo de menos edad como principal predictor y mayor concentración basal de GR, se obtuvo un menor valor delta de SJ tras

finalizar la Ultra Trail. Este modelo de regresión predice el 28,3% de la varianza. Además, se obtuvo otro modelo de regresión lineal múltiple en el que la variable dependiente fue el valor de línea de llegada de  $\Delta$  CK y las principales variables predictivas fueron la Edad y el GR. En este escenario, el modelo de análisis de regresión predice un 18,3% de la varianza.

Como hemos mencionado anteriormente, según el criterio propuesto por Cohen [142], nuestros modelos de regresión podrían considerarse por su valor predictivo, explicando dentro de un contexto de modelo multicausal la influencia del estrés oxidativo sobre el daño muscular y la fatiga después de un esfuerzo severo como corriendo una Ultra Trail.

**TABLA 12 MODELOS DE REGRESIÓN LINEAL**

Modelo	R <sup>2</sup> Ajustada	Coefficiente estandarizado Beta	Error Estandar d	F ( <i>p</i> )
<b>Variable dependiente: <math>\Delta</math></b>				
<b>SJ en línea de meta.</b>	0.283	0.217	0.16389	0.6521 (0.005)
<b>Covariables: Edad, GR.</b>				
<b>Variable Dependente: <math>\Delta</math></b>				
<b>CK en meta</b>	0.183	-0.413	0.15558	3.431 (0.002)
<b>Covariables: Edad, GR.</b>				

Abreviaciones:  $\Delta$ SJ (Incremento Squat Jump;  $\Delta$ CK (Incremento Creatine Kinase); GR (Glutathione reductasa).



## 5. DISCUSIÓN



## 5 DISCUSIÓN

El objetivo general de este estudio es determinar la relación entre el estado oxidativo del plasma de corredores de Ultra Trails y la magnitud de la respuesta inflamatoria sistémica, la pérdida de fuerza del músculo esquelético y el daño muscular post carrera. Para ello se han analizado variables sociodemográficas y antropométricas de los corredores, parámetros indicadores del estado oxidativo en plasma (MDA, grupos carbonilo, GPx y GR), marcadores de daño muscular e inflamación (LDH, CK y PCR), así como variables de rendimiento deportivo (HG y SJ). Mas concretamente, las variables antropométricas y parámetros de desarrollo de fuerza muscular se determinaron antes de iniciar la prueba y meta, mientras que el estado oxidativo del plasma, el daño muscular y la respuesta infamatoria se evaluaron entes del inicio de la prueba, en meta y posteriormente, transcurridas 24 y 48 horas.

### 5.1. Características de los sujetos, rendimiento en carrera y hábitos de entrenamiento

En cuanto a las características de los participantes, se analizaron los datos por sexos y por edades tal y como se recoge en las tablas 2 y 3.

En relación a la edad de los corredores, la media se situó en 40,9 años, en la línea de lo publicado en estudios sobre carreras de largas distancias [143], pero siendo algo inferior a la descrita en la mayoría de los trabajos que, sorprendentemente, suelen superar los 42 años de media [126,144,145]. De hecho, en el estudio de Kim y colaboradores se muestra que la media de edad de los participantes en una super Ultra Trail de 622 Km supera incluso los 50 [146].

Cuando nos fijamos en el género de los participantes, observamos que un 59,4% fueron hombres y un 40,6% mujeres, siendo habitual en las Ultra Trails que participen más hombres que mujeres, mostrando nuestro estudio un porcentaje más elevado de mujeres del que se suele registrar [147,148]. De hecho, es bastante habitual encontrar estudios en los que la muestra únicamente está constituida por hombres [149]. Ha sido en esta última década cuando se han empezado a popularizar este tipo de carreras y consecuentemente se han incrementado el número de trabajos que contemplan en sus resultados las diferencias de género, observándose que el número de hombres es superior al de las mujeres [143,150] en concordancia con nuestros resultados. Estas diferencias podrían deberse a la diferente motivación que lleva a hombres y mujeres a participar en Ultra Trails.

Así, tal y como discuten Knechtle y colaboradores en un estudio comparativo sobre la participación de hombres y mujeres en maratones y Ultra Trails, las diferencias de género podrían deberse a una naturaleza menos competitiva de las mujeres. Mientras que las mujeres presentan una mayor motivación intrínseca y preocupación por la salud, los hombres centrarían más su motivación en ganar las carreras o quedar mejor posicionados que sus oponentes.

Por otro lado, el tiempo medio de carrera fueron 1282 minutos y no se observaron diferencias significativas al comparar el tiempo necesario para finalizar la carrera entre los distintos grupos de estudio por sexo o edad (Tablas 2 y 3, respectivamente). Este resultado no es comparable con otros estudios por ser carreras con características diferentes, sin embargo, otros estudios muestran que la media de edad de los corredores más rápidos se encontraría en torno a los 35 años, que se correspondería con nuestro grupo de corredores jóvenes [151–153]. Asimismo, Suter y colaboradores indican que en la Ultra-Trail du Mont Blanc cuando se analizaron los tiempos de los 5 corredores más rápidos en el grupo de los hombres y de las mujeres de todos los participantes entre los años 2008 y 2019, los corredores masculinos más rápidos presentan unos tiempos de carrera mejores que las 5 mujeres más rápidas, si bien es cierto que cada año las mujeres van reduciendo estas diferencias con respecto a los hombres en especial en aquellas carreras en el rango de los 50-100km [153,154]. En nuestro estudio encontramos resultados similares, dado que, aunque no se observan diferencias estadísticas en los tiempos de carrera entre hombres y mujeres (Tabla 2), lo 5 corredores más rápidos fueron hombres.

En cuanto al entrenamiento previo a la carrera prácticamente no se observaron diferencias en las variables estudiadas entre los diferentes grupos de estudio. Ha sido anteriormente descrito que la experiencia es uno de los mejores predictores de éxito en una ultramaraton [155]. Es reseñable que la media de años corriendo de los participantes en el estudio es de 8 años. Asimismo, la media de carreras de más de 100 Km completadas previamente es de 2,5. Por tanto, se trataría de corredores experimentados sin que se observen diferencias por sexo o edad, tal y como se recoge en las tablas 2 y 3. Por otro lado, en relación a las características del entrenamiento, se estudiaron los días y horas de entrenamiento semanal, así como el número de Km recorridos semanalmente, observándose diferencias significativas únicamente en el número de Km recorridos por los corredores senior frente a los que corren los jóvenes y de mediana edad. Así, la tabla 3 muestra que los corredores del grupo de mayor edad recorren distancias significativamente más cortas, aunque este factor no parece influenciar de forma significativa los tiempos de carrera. De hecho, la edad (en el rango comprendido en nuestro) no parece ser un factor limitante e incluso hay estudios que

indican que aquellos corredores de más edad podrían mantener mejores ritmos de carrera [156]. No se observaron diferencias significativas entre sexos para estas variables. Estos resultados demuestran, en concordancia con lo publicado anteriormente en diferentes tipos de carrera, que el tipo y nivel de entrenamiento en hombres y mujeres siguen los mismos patrones actualmente [150,155] y que el tipo de entrenamiento realizado por los participantes del estudio tiene el mismo patrón que en estudios publicados en carreras de similares características [157]. Hay que destacar, sin embargo, que de los 47 corredores que iniciaron el estudio, sólo finalizaron la carrera el 68%, demostrando la exigencia de este tipo de pruebas. Es importante señalar que, en el caso de los hombres, aproximadamente un 60% finalizaron la carrera, mientras que en el caso de las mujeres sólo lo hicieron un 40%.

Finalmente, en este apartado se recogen también los datos descriptivos de suplementación con diferentes complementos nutricionales antes y durante la carrera. El uso de suplementos dietéticos es muy habitual entre los corredores de ultra resistencia con el objeto de incrementar el rendimiento, evitar daño o acelerar la recuperación tras la carrera. Se observa que un 62,5% de los corredores ingirió algún tiempo de suplemento antes o durante la carrera. Dado que se trata de un estudio descriptivo y no un ensayo clínico en el que se haya controlado la suplementación que reciben los corredores, no podemos garantizar el efecto que éstas hayan podido tener sobre los resultados del estudio, siendo ésta por tanto una de las principales limitaciones del mismo. Si que podemos afirmar, tal y como se recoge en las tablas 2 y 3, que no existen diferencias en el patrón de consumo de las mismas entre sexos o grupos de edad.

## 5.2. Variables antropométricas

En relación a las variables antropométricas susceptibles de cambio a lo largo del estudio, como el peso, el IMC y los porcentajes de masa magra y grasa, se realizaron dos determinaciones, antes de iniciar la carrera y al finalizarla. Como es de esperar, los resultados precarrera indican diferencias significativas en todas las variables analizadas entre sexos, siendo el peso, IMC y porcentaje de masa magra superior en los hombres y el porcentaje de masa grasa superior en las mujeres (Tabla 4). Estos datos se encuentran en la línea de los observados en corredores de Ultra Trails previamente [158]. Tras la finalización de carrera se observa una pérdida significativa de peso, IMC y porcentaje de masa magra en hombres que no se observa en mujeres (Tabla 4). Estos resultados se asemejan a los obtenidos en otros trabajos anteriores [159]. Cuando se tratan estas variables clasificadas en función del grupo etario, no se observan diferencias significativas entre los 3 grupos de edad. Sin embargo, sí se observan diferencias en los valores obtenidos entre

precarrera y meta, observándose una pérdida significativa de peso e IMC en los grupos de mediana edad y senior tras la finalización de la carrera (Tabla 5). Contrariamente el porcentaje de masa magra se incrementó significativamente en los tres grupos de edad, mientras que en el grupo de mayor de edad también incrementó significativamente el porcentaje de masa grasa. Estos cambios en los porcentajes de composición corporal podrían deberse a las alteraciones hídricas que tienen lugar durante la carrera y que se han puesto de manifiesto anteriormente en otros trabajos [137].

### 5.3 Variables de fuerza, Daño muscular, inflamación y recuperación Post-carrera

La realización de Ultra Trails suponen un esfuerzo físico extremo, que genera una alteración transitoria de biomarcadores asociados a condiciones patológicas como procesos inflamatorios y daño muscular, cardiaco o renal [160–162].

En nuestro estudio se han analizado variables de fuerza y parámetros indicadores de daño muscular y procesos inflamatorios, quedando recogidos los resultados en las tablas 6- 8, así como en las figuras 9-20. Hay que especificar que la fuerza muscular sólo se analizó previa a la carrera y posteriormente en meta, mientras que los parámetros de daño muscular e inflamación en el plasma de los corredores se analizaron también los dos días posteriores a la carrera, por ser parámetros cuya recuperación es más lenta [163].

#### 5.3.1. Variables de fuerza y fatiga muscular

En relación a los parámetros de fuerza muscular que se describen en la tabla 6, está descrito que el índice de disminución de la fuerza, medido mediante pruebas como el HG y el SJ, sería un parámetro adecuado de la fatiga muscular [164]. En este sentido, cuando se contempla la muestra total, sin segregación por género o edad, únicamente encontramos diferencias significativas en los pares musculares relacionados con el tren inferior, medidos a través de la plataforma de salto (SJ), sin que se observen diferencias en tren superior (HG). Estos resultados son esperables al tratarse de un ejercicio que afecta principalmente a los músculos de las piernas. Estudios previos sugieren que las Ultra Trails de montaña extremadamente largas inducen menos fatiga que otras de distancias menores que oscilarían entre 100-150Km, debido a que los corredores podrían adoptar estrategias de ritmo mas conservadoras, preservando la integridad muscular y reduciendo la probabilidad de abandono [165,166]. La Ultra Trail de montaña escogida para nuestro estudio tiene una longitud de 108Km y queda claramente demostrada la presencia de fatiga muscular en tren inferior, en consonancia con lo publicado anteriormente, por lo que es posible que la pérdida de fuerza de los

miembros inferiores aumente proporcionalmente a la longitud de la Ultra Trail hasta alcanzar una meseta en carreras extremadamente largas (a partir de 350Km).

En lo que se refiere a las diferencias de género, la tabla 7 y figura 13, muestran diferencias significativas entre hombres y mujeres al inicio de la carrera, tanto en tren superior (HG) como inferior (SJ), desarrollando una mayor fuerza muscular los hombres que las mujeres, tal y como es de esperar, al presentar también más masa muscular (Tabla 4). Se observa también una pérdida de fuerza en tren inferior en meta tanto en hombres como en mujeres y una pérdida de fuerza muscular en tren superior (HG) en meta con respecto a la desarrollada precarrera únicamente en las mujeres (Tabla 7). Estos datos indican que la Ultra Trail realizada induce fatiga muscular en ambos grupos de estudio, especialmente en tren inferior, algo lógico al tratarse de una carrera que implica principalmente un trabajo de piernas. Sin embargo, se observa una fatiga muscular más generalizada en mujeres que hombres, posiblemente porque ya de inicio parten de una menor fuerza muscular, tanto en tren superior como inferior (Tabla 7, figura 13). Es reseñable, por el contrario, que la pérdida de fuerza muscular en tren inferior (SJ) es mayor en hombres que en mujeres, puesto que el punto de partida en los hombres era significativamente superior al de las mujeres, mientras que en meta la fuerza desarrollada por ambos es la misma, indicando una mayor pérdida, por tanto, en hombres que en mujeres (Tabla 7, figura 13). Estudios previos han demostrado que la fatiga muscular podría afectar de forma diferencial a hombres y mujeres. Así, las mujeres parecen fatigarse menos que los hombres durante contracciones isométricas en numerosos grupos musculares, sin embargo cuando aumentando la intensidad de la contracción y se incluyen contracciones dinámicas (como podría ser el caso de nuestro estudio) estas diferencias disminuyen [103,167].

Cuando analizamos los resultados por edad, no observamos diferencias significativas en el desarrollo de fuerza muscular precarrera en tren superior ni inferior entre los distintos grupos de edad incluidos en el estudio (Tabla 8, figura 16). Cuando se analizan los mismos parámetros en meta, no se observan pérdidas significativas en el desarrollo de fuerza muscular en tren superior (HG), mientras que sí se observa fatiga muscular en tren inferior en todos los grupos de edad (Tabla 8, figura 17). Por lo tanto, la edad no parece influir en la aparición de fatiga muscular y pérdida asociada de fuerza muscular, al menos en el rango de edad de los participantes de nuestro estudio (entre 31 y 53 años). Estos datos encajan con la literatura previa, en la que se describe que la edad a la que se alcanza un mejor rendimiento en Ultra Trails es más elevada que para las maratones y que esta edad se incrementa proporcionalmente con la distancia de la carrera [168]. De hecho, Hoffman mostró que en Ultra Trails de más de 100Km los mejores tiempos de carrera se lograron

a la edad de 30-39 años para los hombres y 40-49 años para las mujeres [169]. Teniendo en cuenta que los corredores de nuestro estudio se encuentran en estos rangos de edad, no es sorprendente que no encontremos diferencias en términos de fatiga muscular entre los distintos grupos de edad establecidos en este estudio. Una posible explicación para la edad relativamente avanzada de los ultramaratonianos podría ser el hecho de que la edad media de inicio de la primera Ultra Trail es de aproximadamente 36 años. Esta elevada edad media se debe, posiblemente, a que antes de realizar una Ultra Trail suelen haber completado varias maratones previamente, elevando por tanto la media de edad de los ultramaratonianos frente a los corredores de maratón [168,170].

### 5.3.2. Daño muscular inflamación y recuperación postcarrera

Con respecto a los marcadores de daño muscular (CK y LDH) e inflamación (PCR) en el plasma de los corredores, se realizaron determinaciones previo a la carrera, en meta y 24 y 48 horas después de haber finalizado la carrera. Está ampliamente descrito en la literatura que la realización de este tipo de ejercicio eleva intensamente y de forma transitoria dichos parámetros, hecho que queda claramente constatado en nuestros resultados (Tabla 6 y figuras 10-12).

La CK, alcanzó su valor máximo inmediatamente después de la carrera (un incremento de 24 veces respecto al valor basal) y disminuyó durante las 24 y 48 horas posteriores a la misma sin llegar a normalizarse (Tabla 6, Figura 10). Aunque este parámetro se utiliza rutinariamente como marcador de daño muscular y siempre resulta elevado tras carreras de larga distancia, no existe un consenso generalizado al respecto de su patrón de liberación. Así, en medias maratones y maratones completas en carretera se ha descrito el pico de CK a las 24 horas de haber finalizado la carrera [171,172], mientras que en Ultra Trails más largas (166 km), dicho pico se produce inmediatamente después de la carrera [163,173], en consonancia, por tanto, con los resultados de nuestro estudio. Estas diferencias podrían estar influenciadas por varios factores como podría ser el nivel de entrenamiento de los participantes, la longitud de la carrera o la relación entre la distancia y el cambio de altitud de las carreras [166].

En lo que se refiere a la LDH, al igual que se observa con la CK, alcanzó su máximo en meta y descendió significativamente a las 24 horas, aunque sus valores siguieron elevados. No se observaron cambios a las 48h con respecto al valor obtenido a las 24h, sugiriendo un patrón de recuperación más lento que el de la CK, a pesar de que el incremento en meta no es tan intenso como el de esta enzima (Tabla 6, Figura 11). Estos resultados están en consonancia con los valores descritos anteriormente en otros estudios similares como los de Millet [174], Hoppel [175] o Rubio-Arias [176].

Además de las enzimas CK y LDH como marcadores de daño muscular, se determinó la PCR en el plasma de los corredores dado que su incremento se asocia a la presencia de procesos inflamatorios y es bien sabido que las carreras de ultra resistencia inducen una reacción inflamatoria aguda [168,177,178]. Nuestros resultados muestran una respuesta inflamatoria significativa al finalizar la carrera y que se intensificó significativamente durante las 24 horas posteriores. Una vez transcurridas 48 horas de la finalización de la carrera se observa una disminución de este parámetro, pero sin llegar a normalizarse (manteniéndose en el orden de los valores obtenidos en meta) (Tabla 6, Figura 12).

Por lo tanto, se observa que transcurridas 48 horas desde la finalización de la carrera, ninguno de los parámetros de daño muscular o inflamación se normalizaron en el plasma de los corredores, mostrando que la recuperación tras este tipo de carreras es lenta y requiere varios días de evolución. El daño muscular y las respuestas inflamatorias asociadas a la realización de Ultra Trails rara vez tienen consecuencias adversas entre los atletas; sin embargo, la liberación de cantidades excesivas de proteínas intramusculares al torrente sanguíneo puede afectar negativamente a la función renal, principalmente en condiciones de estrés térmico, deshidratación, problemas renales subyacentes, de uso de antiinflamatorios no esteroideos o en individuos con un entrenamiento inadecuado [166].

Este estudio pretende aportar además una visión sobre las posibles diferencias en función del género o la edad, en lo que se refiere a la aparición de daño muscular e inflamación tras la realización de carreras de Ultra Trail. Es reseñable que no se observa ninguna diferencia en función del género (Tabla 7, Figuras 14-16), por lo que éste no parece ser un determinante en los mecanismos que dan lugar a la presencia de daño muscular y procesos inflamatorios. Por el contrario, otro estudio ha puesto de manifiesto respuestas fisiológicas específicas de género tras una Ultra Trail de 171 Km, determinando que para un rendimiento similar en carrera se observan alteraciones más frecuentes y con efectos de mayor magnitud en los hombres que en las mujeres [179]. Estas diferencias podrían deberse a las distintas características de la carrera o al patrón de entrenamiento de los corredores entre otros factores.

Al segmentar la muestra en tres grupos de edad (jóvenes, mediana edad y seniors) se observa lo siguiente, por un lado, los niveles de CK en meta son significativamente más altos en el grupo de los corredores senior (Tabla 8, Figura 18), indicando que el daño muscular podría ser mayor en estos corredores. Por otro lado, se observa también en los corredores senior que la

recuperación de los valores de LDH tras la carrera es más lenta también en este grupo de corredores, siendo los niveles de LDH significativamente superiores a los de los corredores jóvenes a las 24h horas de haber terminado la carrera. Estos resultados nos indican que a pesar de que no hay diferencias en la aparición de fatiga o en los tiempos de carrera, el daño muscular y la recuperación post-carrera presentan patrones diferentes en los corredores de mayor edad. Estos resultados podrían estar condicionados por el hecho de que los corredores senior corrieron menos kilómetros semanales durante su entrenamiento para la carrera (Tabla 3), tal y como se ha mencionado anteriormente. Es importante señalar también que, aunque no se aprecian diferencias estadísticamente significativas, en la Tabla 5 se aprecia que los corredores senior son los que menor porcentaje de masa magra tienen, a la vez que presentan un mayor porcentaje de masa grasa. Esta diferencia en la composición corporal, que no afecta al IMC, podría estar condicionando también los resultados de daño muscular obtenidos tras la carrera, así como la recuperación del mismo.

#### 5.4 Variables de estrés oxidativo

Este trabajo pretende determinar la relación entre varios marcadores plasmáticos de estrés oxidativo de los atletas y el grado de fuerza y daño muscular tras el ejercicio de Ultra Trail teniendo en cuenta la posible influencia del sexo y la edad del corredor. Es importante destacar que este tipo de estudios presenta limitaciones en cuanto al tamaño de la muestra debido a la dificultad para finalizar la competición por parte de los corredores habiendo muchos abandonos durante la carrera. De hecho, nuestra muestra inicial fue de 47 corredores, de los cuales únicamente 32 finalizaron la misma.

En la Tabla 9 se muestran los datos descriptivos de los parámetros que nos permiten conocer el estado oxidativo del plasma de los participantes en nuestro estudio antes de la carrera, en la línea de meta y en las 24 y 48 horas posteriores a la carrera. En cuanto a las defensas antioxidantes, se determinó la actividad de las enzimas GPx y GR. Se observa un aumento en la actividad GPx tras la carrera y en los días posteriores a la misma, sin que llegue a ser estadísticamente significativo en ningún momento. Sin embargo, la actividad GR sí aumentó significativamente en la línea de meta y alcanzó el valor más alto 24 h después de la carrera, regresando a los valores basales después de 48 h.

En lo que se refiere a los parámetros de daño oxidativo, la peroxidación lipídica (concentración de MDA) también aumentó en la línea de meta, disminuyó 24 horas después de la carrera (coincidiendo con el pico de actividad de la enzima antioxidante GR) y aumentó significativamente de nuevo tras 48 horas. El daño oxidativo a proteínas (contenido de CG) también aumentó inmediatamente después de la carrera y permaneció elevado incluso 48 h después.

Se ha demostrado anteriormente que el ejercicio de ultrarresistencia se asocia a una tasa notablemente mayor de utilización de oxígeno y a la generación y acumulación de ROS [180]. Además, el sistema del glutatión aumenta su actividad para restaurar el equilibrio redox celular cuando aumenta la formación de ROS. Nuestros datos mostraron un aumento del daño oxidativo a macromoléculas (lípidos y proteínas) que podría estar indicando un aumento de los niveles celulares de ROS. El daño por peroxidación lipídica parece aumentar en la línea de meta y 48 h después de la carrera, lo que demuestra la presencia de daño oxidativo en los lípidos dos días después del ejercicio extremo. Se observó, asimismo, un efecto parcialmente recuperador 24 h después de la carrera, como puede verse en la Tabla 9 y Figura 28. A este respecto, estudios previos han mostrado resultados controvertidos en relación con los niveles de MDA en sangre tras el ejercicio de Ultra Trail. Varios estudios mostraron un aumento de los niveles celulares de MDA tras la realización del triatlón Ironman [181,182] o la realización de una Ultra Trail de 233 Km [183]. Por el contrario, otros trabajos no pudieron demostrar un incremento de peroxidación lipídica tras el ejercicio de resistencia en una Ultra Trail de 103 Km y 7000m de desnivel ascendente (de características similares a la nuestra) [184] o en una prueba de ultra resistencia en nadadores [185]. Skenderi y colaboradores [126] incluso describieron una disminución de los niveles de MDA 48 horas después de la carrera en comparación con los valores de control y posteriores a la carrera. Sin embargo, en estos estudios, el tipo de deporte, la distancia, la altitud acumulada o las características antropométricas de la muestra podrían estar influyendo en estos resultados. También cabe mencionar que estas diferencias pueden atribuirse a aspectos metodológicos, dado que el estudio de Spanidis presenta un tamaño muestral escaso (algo habitual en este tipo de estudios tal y como se ha justificado anteriormente). Además, en dichos estudios se utilizó la técnica TBARS (sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico determinadas espectrofotométricamente) que es una medida menos robusta de la peroxidación lipídica [180].

En cuanto al análisis del contenido de CG, este parámetro se mantuvo significativamente elevado en todos los puntos temporales del estudio (línea de meta, 24 h después de la carrera y 48 h después de la carrera). Curiosamente, Spanidis y colaboradores [184] no encontraron diferencias significativas para este parámetro después de una carrera de montaña de características similares a la nuestra. Esta discrepancia se explicaría posiblemente debido a un tamaño muestral insuficiente, tal y como se ha mencionado arriba. Por el contrario, Turner et al., [128] sí demostraron un aumento del contenido de CG en plasma tras una carrera de Ultra Trail, confirmando así el daño oxidativo de las proteínas tras el ejercicio de ultra resistencia.

En cuanto a las enzimas del sistema glutatión, no se observaron diferencias significativas para la actividad GPx. Por el contrario, la actividad GR mostró un aumento significativo en la línea de meta que fue incluso mayor 24 h después de la carrera, coincidiendo curiosamente con la recuperación parcial de la concentración de MDA. Aunque ambas enzimas se localizan principalmente en el compartimento intracelular, su actividad plasmática se ha utilizado ampliamente como medida del estado antioxidante [186–189]. En el caso del ejercicio de ultra-resistencia, estudios previos muestran resultados contradictorios en lo que respecta a las enzimas antioxidantes [181,184,190,191], pero nuestros resultados apoyan la hipótesis de un mecanismo compensatorio basado en un aumento temporal de la defensa antioxidante para compensar un insulto oxidativo [188,192]. Es necesario resaltar además que, aunque la actividad de estas dos enzimas se ha utilizado ampliamente para evaluar la presencia de estrés oxidativo, la GR se considera el factor limitante de este sistema antioxidante [193]. Es plausible que el aumento de la actividad del GR no vaya acompañado de una mayor actividad de la GPx debido a que otras enzimas antioxidantes como la catalasa o la paraoxonasa también son capaces de degradar el peróxido de hidrógeno y podrían verse afectadas por el ejercicio intenso [194,195].

Además, en la tabla 12 informamos de las correlaciones significativas existentes entre los valores basales de las variables de estado oxidativo y los parámetros indicadores de daño muscular y fatiga. Así, a pesar de que la actividad GPx no mostró alteraciones significativas a lo largo del estudio, su actividad basal si correlaciona negativamente y de forma significativa con el  $\Delta$ CK a las 48 horas postcarrera. Además, se observa una correlación negativa significativa entre la actividad basal de GR de los corredores y el grado de alteración de la membrana muscular tras la carrera. Así, la actividad basal de esta enzima se correlacionó con la  $\Delta$ LDH en la línea de meta, tras 24 h y 48 h y con la  $\Delta$ CK en la línea de meta y tras 24 h. Además, los niveles basales de daño

oxidativo a proteínas (contenido de CG) también mostraron una correlación positiva significativa con la magnitud de la lesión muscular tras la carrera ( $\Delta$ LDH) tras 24 h y 48 h) (Tabla 12). Es importante señalar que asumimos que la CK y la LDH séricas evalúan la alteración de la membrana muscular y no se correlacionan necesariamente con el daño estructural muscular. Además, también hemos informado de una correlación positiva significativa entre la actividad GR basal y la mejora en la ejecución en la plataforma de salto ( $\Delta$ SJ), así como, una correlación negativa significativa entre los niveles basales de peroxidación lipídica (concentración de MDA) y la mejora en la ejecución en el Hand Grip ( $\Delta$ HG). Aunque existe una limitación en la potencia del coeficiente de correlación para asumir una causalidad evidente entre el estrés oxidativo y la fatiga muscular (medida a través de la ejecución en HG y SJ), estos hallazgos novedosos, sugieren que un estado oxidativo plasmático basal más fuerte podría mejorar el desarrollo de fuerza muscular y reducir la fatiga durante la práctica deportiva de ultra-resistencia. En concordancia con nuestros resultados, Devrim-Lanpir y colaboradores mostraron que la capacidad antioxidante total del suero de corredores de Ultra Trails y triatletas correlaciona positivamente con el tiempo observado hasta el agotamiento cuando se sometieron a una prueba de ejercicio exhaustivo agudo (cicloergómetro (45 min a 65%  $VO_2$ máx) seguido inmediatamente de una prueba en cinta rodante (75%  $VO_2$ máx hasta el agotamiento) [196]. Sin embargo, son necesarios más estudios para aumentar el número de participantes y validar los presentes resultados, dado que en la actualidad no existen a penas estudios en la literatura que aborden esta cuestión.

Cuando se abordan las posibles diferencias de género (Tabla 10 y Figuras 26-29), se observa que la actividad de las defensas antioxidantes no se ve influenciada por este factor (Figuras 25 y 26). En lo que se refiere al daño oxidativo a macromoléculas, la concentración de MDA 48 h después de la carrera fue mayor en los corredores varones que en las mujeres (Figura 27), mientras que las mujeres presentaron un contenido en GC significativamente mayor que los hombres al final de la carrera y 48 h después (Figura 28). Sorprende que las atletas femeninas mostraron un mayor contenido de CG y menores niveles de MDA que los atletas masculinos, dado que presentan una menor masa muscular y mayor porcentaje de masa grasa corporal (Tabla 4). Casi no existe bibliografía que tenga en cuenta las diferencias entre sexos en el tipo de pruebas y aunque varios estudios incluyen a corredoras en sus investigaciones, la mayoría no describen diferencias de sexo en los parámetros medidos [197,198]. En 2008 Miyata y colaboradores estudiaron el daño oxidativo al DNA tras una Ultra Trail de dos días de duración y aunque

encontraron la presencia de daño tras la realización de la carrera, no observaron diferencias significativas en función del género de los corredores [199]. Sin embargo, recientemente, Devrim-Lanpir et al., informaron de una interacción positiva significativa entre el tiempo hasta el agotamiento y la ingesta dietética de antioxidantes en varones, que no se observó en mujeres, [196]. Esta carencia de literatura sobre las diferencias de género probablemente sea debida a la dificultad de conseguir muestras de tamaño suficiente tal y como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, visto el incremento de la presencia de mujeres en los últimos tiempos en este tipo de carreras, es posible que en años venideros se puedan extraer conclusiones al respecto de estas posibles diferencias.

Los datos de la Tabla 11 muestran el efecto de la edad sobre el estado oxidativo de los corredores. Únicamente la peroxidación lipídica (concentración de MDA) se vio afectada significativamente por la edad. Así, la concentración de MDA fue significativamente mayor en los corredores seniors (45-53 años) en comparación con los de mediana edad (38-44) y los jóvenes competidores (31-37), tanto en línea de meta como 48 h después de la carrera. Una posible explicación para estos resultados sería la diferente composición corporal de los corredores senior con respecto a los de mediana edad y los jóvenes, de forma que se observa un mayor porcentaje de grasa corporal junto con una menor masa muscular en comparación tanto al inicio como tras la finalización de la carrera (Tabla 5). Un mayor porcentaje de masa grasa facilitaría por tanto la peroxidación de lípidos y podría justificar unos valores más elevados de MDA a lo largo del estudio. Estos resultados concuerdan con los de Hattori y cols. que informaron de que en una Ultra Trail de 130 Km que se realiza en dos etapas, los corredores de menos de 45 años presentaban niveles más bajos de ROS en todos los puntos de carrera [117] en comparación con corredores de mayor edad. De nuevo, serían necesarias series más amplias para estudiar el valor predictivo de este ensayo y considerar si una suplementación antioxidante personalizada podría favorecer la recuperación fisiológica tras grandes esfuerzos físicos.

Por otro lado, al realizar el análisis de regresión lineal múltiple utilizando Edad y la actividad GR como variables predictoras, se obtuvo una ecuación de regresión significativa para la variable dependiente Valor delta de SJ ( $\Delta$ SJ meta) (Tabla 13). Este análisis indicaría que una menor edad como principal predictor y una mayor concentración basal de GR, serían predictores de una menor pérdida de fuerza en la prueba de la plataforma de salto (SJ) entre precarrera y meta ( $\Delta$ SJ meta). Este modelo de regresión es capaz de predecir el 28,3% de la varianza. Además,

se obtuvo otro modelo de regresión lineal múltiple en el que la variable dependiente era el valor  $\Delta CK$  en meta y como principales variables predictoras volvíamos a obtener la edad y el GR. En este escenario, el modelo de análisis de regresión predice un 18,3% de la varianza.

Por lo tanto, según el criterio propuesto por Cohen [38], nuestros modelos de regresión podrían ser considerados por su valor predictivo, explicando dentro de un contexto de modelo multicausal la influencia la edad (junto con la actividad GR) sobre la pérdida de fuerza y la aparición de fatiga observada en los corredores de Ultra Trail (Tabla 6), aunque como se haya mencionado anteriormente la edad media de los corredores en estas carreras cada vez es más elevada [155].



## 6. CONCLUSIONES



## 6 CONCLUSIONES.

1. La realización de una prueba de Ultra Trail induce un deterioro del estado oxidativo del plasma de los corredores tanto al finalizar la carrera como durante los dos días posteriores a la misma.
2. Se observa la presencia de daño muscular, pérdida de producción de fuerza del músculo esquelético y una respuesta inflamatoria aguda tras la realización de prueba de Ultra Trail que sólo se recupera parcialmente durante los dos días posteriores a la misma.
3. Se demuestra una relación entre los valores basales del estado oxidativo del plasma de corredores de Ultra Trail y la magnitud de la fatiga y daño muscular posteriores a la carrera, pero no con la intensidad de la respuesta inflamatoria.
4. Se observa una influencia significativa tanto del género como de la edad de los corredores sobre los parámetros analizados en este estudio. Ambos factores condicionan el estado oxidativo del suero de los corredores tras la realización de una Ultra Trail y durante su posterior recuperación. La edad, además, podría ser un predictor de la pérdida de fuerza muscular tras la carrera.



## 7. BIBLIOGRAFÍA



## 7 Bibliografía

1. Reinheckel, T.; Noack, H.; Lorenz, S.; Wiswedel, I.; Augustin, W. Comparison of Protein Oxidation and Aldehyde Formation during Oxidative Stress in Isolated Mitochondria. *Free Radic. Res.* **1998**, *29*, 297–305, doi:10.1080/10715769800300331.
2. DJ, B. What Is Oxidative Stress? *Metabolism.* **2000**, *49*, 3–8, doi:10.1016/S0026-0495(00)80077-3.
3. Sies, H.; Masumoto, H. Ebselen as a Glutathione Peroxidase Mimic and as a Scavenger of Peroxynitrite. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *38*, 229–246, doi:10.1016/s1054-3589(08)60986-2.
4. Klatt, P.; Lamas, S. *Regulation of Protein Function by S-Glutathiolation in Response to Oxidative and Nitrosative Stress*;
5. Brown, G.C.; Neher, J.J. Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *41*, 242–247, doi:10.1007/S12035-010-8105-9/EMAIL/CORRESPONDENT/C1/NEW.
6. Silvestre, D.; Miranda, M.; Muriach, M.; Almansa, I.; Jareño, E.; Romero, F.J. Frozen Breast Milk at -20°C and -80°C: A Longitudinal Study of Glutathione Peroxidase Activity and Malondialdehyde Concentration. *J. Hum. Lact.* **2010**, *26*, 35–41, doi:10.1177/0890334409342987.
7. Serge Bottari, C.P.; Cipak Gasparovic, A.; Zarkovic, N.; Zarkovic, K.; Semen, K.; Kaminsky, D.; Yelisyeyeva, O.; Bottari, S.P. Themed Section: Redox Biology and Oxidative Stress in Health and Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1771, doi:10.1111/bph.v174.12/issuetoc.
8. Halliwell, B. Commentary Oxidative Stress, Nutrition and Health. Experimental Strategies for Optimization of Nutritional Antioxidant Intake in Humans. *Free Radic. Res.* **1996**, *25*, 57–74, doi:10.3109/10715769609145656.
9. B, H. Free Radicals and Antioxidants: Updating a Personal View. *Nutr. Rev.* **2012**,

- 70, 257–265, doi:10.1111/J.1753-4887.2012.00476.X.
10. Halliwell, B. Free Radicals and Antioxidants: Updating a Personal View. **1994**, doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.
  11. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease*; 1984; Vol. 219;.
  12. Christopher K. Mathews, K.E.V.H. *BIOQUIMICA 2ª ED*; 2 Edition.; McGraw-Hill, Interamericana de España. (1 enero 1998): Madrid, 1998; ISBN 8448602137.
  13. Sevanian, A.; Nordenbrand, K.; Kim, E.; Ernster, L.; Hochstein, P. Microsomal Lipid Peroxidation: The Role of NADPH--Cytochrome P450 Reductase and Cytochrome P450. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, 8, 145–152.
  14. Kinnula, V.L.; Crapo, J.D.; Raivio, K.O. Generation and Disposal of Reactive Oxygen Metabolites in the Lung. *Lab. Invest.* **1995**, 73, 3–19.
  15. Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C.J.; Telser, J. Role of Oxygen Radicals in DNA Damage and Cancer Incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 266, 37–56.
  16. Kim, C.; Kim, J.-Y.; Kim, J.-H. Cytosolic Phospholipase A(2), Lipoxygenase Metabolites, and Reactive Oxygen Species. *BMB Rep.* **2008**, 41, 555–559, doi:10.5483/bmbrep.2008.41.8.555.
  17. Bredt, D.S.; Hwang, P.M.; Glatt, C.E.; Lowenstein, C.; Reed, R.R.; Snyder, S.H. Cloned and Expressed Nitric Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome P-450 Reductase. *Nature* **1991**, 351, 714–718, doi:10.1038/351714A0.
  18. Lamas, S.; Marsden, P.A.; Li, G.K.; Tempst, P.; Michel, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase: Molecular Cloning and Characterization of a Distinct Constitutive Enzyme Isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 6348–6352, doi:10.1073/pnas.89.14.6348.
  19. Förstermann, U.; Sessa, W.C. Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function. *Eur. Heart J.* **2012**, 33, 829–837, doi:10.1093/eurheartj/ehr304.

20. Weiss, S.J.; LoBuglio, A.F. Phagocyte-Generated Oxygen Metabolites and Cellular Injury. *Lab. Invest.* **1982**, *47*, 5–18.
21. Nathan, C.; Xie, Q.W. Regulation of Biosynthesis of Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13725–13728, doi:10.1016/s0021-9258(17)36703-0.
22. Riley, P.A. Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, *65*, 27–33, doi:10.1080/09553009414550041.
23. Frei, B.; Stocker, R.; England, L.; Ames, B.N. Ascorbate: The Most Effective Antioxidant in Human Blood Plasma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1990**, *264*, 155–163, doi:10.1007/978-1-4684-5730-8\_24.
24. Franch, P. *Actividad Antioxidante de La Cerveza: Estudios in Vitro e in Vivo*; Salud., C. de C. y, Ed.; Centro de Cerveza y Salud. 2001: Madrid, 2001;
25. Rice-Evans, C.; Burdon, R. Free Radical-Lipid Interactions and Their Pathological Consequences. *Prog. Lipid Res.* **1993**, *32*, 71–110, doi:10.1016/0163-7827(93)90006-I.
26. Klaunig, J.E.; Xu, Y.; Bachowski, S.; Jiang, J.; Wallace, K.B. *Free-Radical Oxygen-Induced Changes in Chemical Carcinogenesis.*; 1997;
27. Torres, M.C.; Beltran, S.; Martinez-Alvarez, J.R.; Franch, P. Valls-Bellés V, Muñoz P, Codoñer-Defatted Milled Grape Seed Protects Adriamycin-Treated Hepatocytes against Oxidative Damage. *Eur* **2006**, *45 SRC-*, 251–258.
28. Torres, M.C.; Boix, L.; Gonzalez-Sanjose, M.L.; Tocopherol, M.D.A.; Franch, P. Valls-Bellés V, Muñoz P, Codoñer-Alpha-HNE and 8-OHdG Levels in Liver and Heart Mitochondria of Adriamycin-Treated Rats Fed with Alcohol-Free Beer. *Toxicology* **2008**, *249*, 97–101.
29. Park, S.G.; Kim, J.-H.; Xia, Y.; Sung, J.-H. Generation of Reactive Oxygen Species in Adipose-Derived Stem Cells: Friend or Foe?, doi:10.1517/14728222.2011.628315.
30. Davies, K.J.A. Oxidative Stress: The Paradox of Aerobic Life. *Biochem. Soc.*

- Symp.* **1995**, *61*, 1–31, doi:10.1042/bss0610001.
31. Halliwell, B. Free Radicals and Antioxidants - Quo Vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 125–130, doi:10.1016/j.tips.2010.12.002.
  32. Liu, Y.; Zhao, H.; Li, H.; Kalyanaraman, B.; Nicolosi, A.C.; Gutterman, D.D. Mitochondrial Sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation Play a Key Role in Flow-Mediated Dilation in Human Coronary Resistance Arteries. **2003**, doi:10.1161/01.RES.0000091261.19387.AE.
  33. Jackson, M.J.; Papa, S.; Bolaños, J.; Bruckdorfer, R.; Carlsen, H.; Elliott, R.M.; Flier, J.; Griffiths, H.R.; Heales, S.; Holst, B.; et al. Antioxidants, Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Gene Induction and Mitochondrial Function. *Mol. Aspects Med.* **2002**, *23*, 209–285, doi:10.1016/s0098-2997(02)00018-3.
  34. Sindicato Médico del Uruguay., F.; Fundación Universitaria de Ciencia. Oficina del Libro., A.; Martínez, A.; Zeppi, M.; Ferreira, M.; Pintos, Á. *La Revista Médica Del Uruguay.*; Sindicato Médico del Uruguay, 2004; Vol. 20;.
  35. Mwendwa 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **2019**, *176*, 139–148, doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318063.OXIDATIVE.
  36. Muriach, M.; Flores-Bellver, M.; Romero, F.J.; Barcia, J.M. Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/102158.
  37. Xiao, Q.; Yan, L.; Han, J.; Yang, S.; Tang, Y.; Li, Q.; Lao, X.; Chen, Z.; Xiao, J.; Zhao, H.; et al. Metabolism-Dependent Ferroptosis Promotes Mitochondrial Dysfunction and Inflammation in CD4(+) T Lymphocytes in HIV-Infected Immune Non-Responders. *EBioMedicine* **2022**, *86*, 104382, doi:10.1016/j.ebiom.2022.104382.
  38. Shreenath, A.P.; Ameer, M.A.; Dooley, J. Selenium Deficiency. In; Treasure Island (FL), 2023.
  39. Noriega-Navarro, R.; Martínez-Tapia, R.J.; Osornio-Hernández, J.L.; Landa-

- Navarro, L.; Xinastle-Castillo, L.O.; Landa, A.; Navarro, L. Neuroprotection of Thioredoxin1 in the Brain. *Curr. Alzheimer Res.* **2023**, *20*, 318–340, doi:10.2174/1567205020666230809145041.
40. Shojai, S.; Haeri Rohani, S.-A.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Habibi-Rezaei, M. Human Serum Albumin in Neurodegeneration. *Rev. Neurosci.* **2022**, *33*, 803–817, doi:10.1515/revneuro-2021-0165.
  41. Münch, J.; Prasuhn, J.; Laugwitz, L.; Fung, C.-W.; Chung, B.H.-Y.; Bellusci, M.; Mayatepek, E.; Klee, D.; Distelmaier, F. Neuroimaging in Primary Coenzyme-Q(10)-Deficiency Disorders. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2023**, *12*, doi:10.3390/antiox12030718.
  42. Carlsen, M.H.; Halvorsen, B.L.; Holte, K.; Bøhn, S.K.; Dragland, S.; Sampson, L.; Willey, C.; Senoo, H.; Umezono, Y.; Sanada, C.; et al. *The Total Antioxidant Content of More than 3100 Foods, Beverages, Spices, Herbs and Supplements Used Worldwide*; 2010;
  43. Young, I.S.; Woodside, J. V Antioxidants in Health and Disease. *J. Clin. Pathol.* *54*, 176–186.
  44. Cheal, S.M.; Ng, M.; Barrios, B.; Miao, Z.; Kalani, A.K.; Meares, C.F. *Supporting Information for Mapping Protein-Protein Interactions by Localized Oxidation: Consequences of the Reach of Hydroxyl Radical* □;
  45. Stadtman, E.R.; Levine, R.L. Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins. *Amino Acids* **2003**, *25*, 207–218, doi:10.1007/s00726-003-0011-2.
  46. Griffiths, H.R.; Møller, L.; Bartosz, G.; Bast, A.; Bertoni-Freddari, C.; Collins, A.; Cooke, M.; Coolen, S.; Haenen, G.; Hoberg, A.M.; et al. Biomarkers. *Mol. Aspects Med.* **2002**, *23*, 101–208.
  47. Obama, T.; Kato, R.; Masuda, Y.; Takahashi, K.; Aiuchi, T.; Itabe, H. Analysis of Modified Apolipoprotein B-100 Structures Formed in Oxidized Low-Density Lipoprotein Using LC-MS/MS. *Proteomics* *7*, 2132–2141.

48. Miyata, T.; Inagi, R.; Asahi, K.; Yamada, Y.; Horie, K.; Sakai, H.; Uchida, K.; Kurokawa, K. *Generation of Protein Carbonyls by Glycooxidation and Lipoxidation Reactions with Autoxidation Products of Ascorbic Acid and Polyunsaturated Fatty Acids*;
49. Xu, B.J.; Yuan, S.H.; Chang, S.K.C. Comparative Studies on the Antioxidant Activities of Nine Common Food Legumes against Copper-Induced Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Vitro. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S522-7, doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00464.x.
50. Janero, D.R. Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *9*, 515–540, doi:10.1016/0891-5849(90)90131-2.
51. Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11*, 81–128.
52. Pryor, W.A.; Stanley, J.P. Suggested Mechanism for the Production of Malonaldehyde during the Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids. Nonenzymic Production of Prostaglandin Endoperoxides during Autoxidation. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3615–3617, doi:10.1021/jo00912a038.
53. Willson, R.L. Hydroxyl Radicals and Biological Damage in Vitro: What Relevance in Vivo? *Ciba Found. Symp. 65 - Oxyg. Free Radicals Tissue Damage* **1979**, 19–42.
54. Halliwell, B. The Antioxidant Paradox. *Lancet (London, England)* **2000**, *355*, 1179–1180, doi:10.1016/S0140-6736(00)02075-4.
55. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine: Some Problems and Concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *246*, 501–514, doi:https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90305-X.
56. Halliwell, B. Biochemistry of Oxidative Stress. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1147–1150, doi:10.1042/BST0351147.

57. Sies, H.; Murphy, M.E. Role of Tocopherols in the Protection of Biological Systems against Oxidative Damage. *J. Photochem. Photobiol. B.* **1991**, *8*, 211–218, doi:10.1016/1011-1344(91)80061-1.
58. Fahey, R.C.; Buschbacher, R.M.; Newton, G.L. The Evolution of Glutathione Metabolism in Phototrophic Microorganisms. *J. Mol. Evol.* **1987**, *25*, 81–88, doi:10.1007/BF02100044.
59. Dringen, R. Metabolism and Functions of Glutathione in Brain. *Prog. Neurobiol.* **2000**, *62*, 649–671, doi:10.1016/s0301-0082(99)00060-x.
60. Griffith, O.W. Biologic and Pharmacologic Regulation of Mammalian Glutathione Synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 922–935, doi:10.1016/S0891-5849(99)00176-8.
61. Meister, A.; Anderson, M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711–760, doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
62. Kosower, N.S.; Kosower, E.M.; Wertheim, B.; Correa, W. Diamide, a New Reagent for the Intracellular Oxidation of Glutathione to the Disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *37* 4, 593–596.
63. McCord, J.M. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 652–659, doi:10.1016/S0002-9343(00)00412-5.
64. Van Vleet, J.F.; Boon, G.D.; Ferrans, V.J. Induction of Lesions of Selenium-Vitamin E Deficiency in Ducklings Fed Silver, Copper, Cobalt, Tellurium, Cadmium, or Zinc: Protection by Selenium or Vitamin E Supplements. *Am. J. Vet. Res.* *42*, 1206–1217.
65. Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V.M.; Dowd, C.A. Structure, Function and Evolution of Glutathione Transferases: Implications for Classification of Non-Mammalian Members of an Ancient Enzyme Superfamily. *Biochem. J.* **2001**, *360*, 1–16, doi:10.1042/0264-6021:3600001.
66. Brigelius-Flohé, R. Glutathione Peroxidases and Redox-Regulated Transcription

- Factors. *Biol. Chem.* **2006**, 387, 1329–1335, doi:10.1515/BC.2006.166.
67. Styskal, J.; Van Remmen, H.; Richardson, A.; Salmon, A.B. Oxidative Stress and Diabetes: What Can We Learn about Insulin Resistance from Antioxidant Mutant Mouse Models? *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 46–58.
  68. Ketterer, B. Detoxication Reactions of Glutathione and Glutathione Transferases. *Xenobiotica.* **1986**, 16, 957–973, doi:10.3109/00498258609038976.
  69. Paukert, T.; Sailer, R.; Strauss, W.S.L.; Schubert-Zsilavec, M.; Zimmer, A. Glutathione Peroxidase Isoenzymes in Human Tumor Cell Lines. *Pharmazie* **2011**, 66, 894–898.
  70. Schramm, H.; Robertson, L.W.; Oesch, F. Differential Regulation of Hepatic Glutathione Transferase and Glutathione Peroxidase Activities in the Rat. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, 34, 3735–3739, doi:10.1016/0006-2952(85)90239-4.
  71. McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6049–6055, doi:10.1016/S0021-9258(18)63504-5.
  72. Fridovich, I. Superoxide Dismutases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1974, 35–97.
  73. Zeisel, S.H.; Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. Is Maternal Diet Supplementation Beneficial? Optimal Development of Infant Depends on Mother's Diet. *Am j Clin Nut* 89 ppS *Superoxide dismutase multigene Fam. a Comp. CuZnSOD SOD1 MnSOD SOD2 ECSOD SOD3 gene Struct. Evol. Expr. Free Radic Biol Med* 33749 **2002**, 33, 685S – 687.
  74. Tolbert, N.E.; Essner, E. Microbodies: Peroxisomes and Glyoxysomes. *J. Cell Biol.* **91**, 271s-283s.
  75. Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol. Rev.* **1979**, 59, 527–605, doi:10.1152/physrev.1979.59.3.527.
  76. Abudu, N.; Miller, J.J.; Attaelmannan, M.; Levinson, S.S. Vitamins in Human Arteriosclerosis with Emphasis on Vitamin C and Vitamin E. *Clin. Chim. Acta*

- 2004**, 339, 11–25, doi:10.1016/J.CCCN.2003.09.018.
77. Rizvi, S.; Raza, S.T.; Ahmed, F.; Ahmad, A.; Abbas, S.; Mahdi, F. The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* **2014**, *14*, 157–165.
  78. Chertow, B. Advances in Diabetes for the Millennium: Vitamins and Oxidant Stress in Diabetes and Its Complications. *MedGenMed* **2004**, *6*, 4.
  79. Ashton, T.; Young, I.S.; Peters, J.R.; Jones, E.; Jackson, S.K.; Davies, B.; Rowlands, C.C. Electron Spin Resonance Spectroscopy, Exercise, and Oxidative Stress: An Ascorbic Acid Intervention Study. *J. Appl. Physiol.* **1999**, *87*, 2032–2036, doi:10.1152/jappl.1999.87.6.2032.
  80. Rumsey, S.C.; Levine, M. Absorption, Transport, and Disposition of Ascorbic Acid in Humans-Chemistry, Metabolism, and Uses. *Biochem* **1998**, *9*, 116–130.
  81. Bravo, L. *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*; 1998;
  82. Valls Bellés V, Codoñer Franch P, González San José ML, M.R.P. *Biodisponibilidad de Los Flavonoides de La Cerveza. Efecto Antioxidante “in Vivo”*; Centro de Información Cerveza y Salud, Ed.; Madrid, 2005;
  83. Aboul-Enein, H.Y.; Kruk, I.; Kładna, A.; Lichszteid, K.; Michalska, T. Scavenging Effects of Phenolic Compounds on Reactive Oxygen Species. *Biopolymers* **2007**, *86*, 222–230, doi:10.1002/bip.20725.
  84. Pazos, M.; Andersen, M.L.; Medina, I.; Skibsted, L.H. Efficiency of Natural Phenolic Compounds Regenerating  $\alpha$ -Tocopherol from  $\alpha$ -Tocopheroxyl Radical. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3661–3666, doi:10.1021/jf063165l.
  85. Vinson, J.A.; Jang, J.; Yang, J.; Dabbagh, Y.; Liang, X.; Serry, M.; Proch, J.; Cai, S. Vitamins and Especially Flavonoids in Common Beverages Are Powerful in Vitro Antioxidants Which Enrich Lower Density Lipoproteins and Increase Their Oxidative Resistance after Ex Vivo Spiking in Human Plasma. *J. Agric. Food*

- Chem.* **1999**, *47*, 2502–2504, doi:10.1021/jf9902393.
86. Garcia-Alonso, F.J.; Guidarelli, A.; Periago, M.J. Phenolic-Rich Juice Prevents DNA Single-Strand Breakage and Cytotoxicity Caused by Tert-Butylhydroperoxide in U937 Cells: The Role of Iron Chelation. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 457–466, doi:10.1016/J.JNUTBIO.2006.08.003.
87. Shoeb, M.; Jaspars, M.; MacManns, S.M.; Celik, S.; Nahar, L.; Kong-Thoo-Lin, P.; Sarker, S.D. Anti-Colon Cancer Potential of Phenolic Compounds from the Aerial Parts of *Centaurea Gigantea* (Asteraceae) Med, ; . **2007**, *61 SRC-*, 164–169.
88. Busch, C.; Burkard, M.; Leischner, C.; Lauer, U.M.; Frank, J.; Venturelli, S. Epigenetic Activities of Flavonoids in the Prevention and Treatment of Cancer. *Clin. Epigenetics* **2015**, *7*, doi:10.1186/S13148-015-0095-Z/FIGURES/1.
89. Böhm, V.; Lietz, G.; Olmedilla-Alonso, B.; Phelan, D.; Reboul, E.; Bánati, D.; Borel, P.; Corte-Real, J.; De Lera, A.R.; Desmarchelier, C.; et al. From Carotenoid Intake to Carotenoid Blood and Tissue Concentrations-Implications for Dietary Intake Recommendations. *Nutr. Rev.* **2021**, *79*, 544–573, doi:10.1093/NUTRIT/NUAA008.
90. Muriach, M.; Bosch-Morell, F.; Alexander, G.; Blomhoff, R.; Barcia, J.; Arnal, E.; Almansa, I.; Romero, F.J.; Miranda, M. Lutein Effect on Retina and Hippocampus of Diabetic Mice. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 979–984, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2006.06.023.
91. Silvestre, D.; Miranda, M.; Muriach, M.; Almansa, I.; Jareño, E.; Romero, F.J. Antioxidant Capacity of Human Milk: Effect of Thermal Conditions for the Pasteurization. *Acta Paediatr.* **2008**, *97*, 1070–1074.
92. PE, B.; S, M.; JC, S. Carotenoid Absorption in Humans. *Methods Enzymol.* **1993**, *214*, 3–17, doi:10.1016/0076-6879(93)14048-N.
93. Leo, M.A.; Ahmed, S.; Aleynik, S.I.; Siegel, J.H.; Kasmin, F.; Lieber, C.S. Carotenoids and Tocopherols in Various Hepatobiliary Conditions. *J. Hepatol.* **1995**, *23*, 550–556, doi:10.1016/0168-8278(95)80061-1.

94. Stahl, W.; Van Den Berg, H.; Arthur, J.; Bast, A.; Dainty, J.; Faulks, R.M.; Gärtner, C.; Haenen, G.; Hollman, P.; Holst, B.; et al. Bioavailability and Metabolism. *Mol. Aspects Med.* **2002**, *23*, 39–100, doi:10.1016/S0098-2997(02)00016-X.
95. Stahl, W.; Schwarz, W.; Sies, H. Human Serum Concentrations of All-Trans Beta- and Alpha-Carotene but Not 9-Cis Beta-Carotene Increase upon Ingestion of a Natural Isomer Mixture Obtained from *Dunaliella Salina* (Betatene). *J. Nutr.* *123*, 847–851.
96. Olson, J.A.; Krinsky, N.I. Introduction: The Colorful, Fascinating World of the Carotenoids: Important Physiologic Modulators. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1547–1550, doi:10.1096/fasebj.9.15.8529833.
97. Young, A.J.; Lowe, G.M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* *385*, 20–27.
98. Böhm, F.; Edge, R.; Truscott, G. Interactions of Dietary Carotenoids with Activated (Singlet) Oxygen and Free Radicals: Potential Effects for Human Health. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 205–216, doi:10.1002/mnfr.201100222.
99. Li, W.; Hosseinian, F.S.; Tsopmo, A.; Friel, J.K.; Beta, T. Evaluation of Antioxidant Capacity and Aroma Quality of Breast Milk. *Nutrition* **2009**, *25*, 105–114, doi:10.1016/j.nut.2008.07.017.
100. Herrera, E.; Jiménez, R.; Aruoma, O.I.; Hercberg, S.; Sánchez-García, I.; Fraga, C. Aspects of Antioxidant Foods and Supplements in Health and Disease. **2009**, doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00177.x.
101. OMS *Plan de Acción Mundial Sobre Actividad Física 2018-2020. Más Personas Activas Para Un Mundo Sano*; 2019; ISBN 9789241514187.
102. de la Salud, O.M. *Plan de Acción Mundial Sobre Actividad Física 2018-2030: Personas Más Activas Para Un Mundo Más Sano*; Organización Mundial de la Salud, 2019;

103. Hunter, S.K. Sex Differences and Mechanisms of Task-Specific Muscle Fatigue. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **2009**, *37*, 113–122, doi:10.1097/JES.0b013e3181aa63e2.
104. Ismael Pérez <https://www.runnersworld.com/es/noticias-running/a30207648/kilometros-diarios-running-espanoles-strava/> Available online: <https://www.runnersworld.com/es/noticias-running/a30207648/kilometros-diarios-running-espanoles-strava/>.
105. Ortiz Fernández, A. Las Carreras Por Montaña. Auge, Participación y Seguimiento. **2017**.
106. Urbaneja, J.S.; Farias, E.I. Trail Running in Spain. Origin, Evolution and Current Situation; Natural Areas. *Retos* **2018**, *2041*, 123–128.
107. MJ Joyner, E.C. Endurance Exercise Performance: The Physiology of Champions. *J Physiol* **2008**, *586*, 35–44, doi:10.1113/jphysiol.2007.143834.
108. Urbaneja, J.S.; Farias, E.I. El Trail Running (Carreras de o Por Montaña) En España. Inicios, Evolución y (Actual) Estado de La Situación (Trail Running in Spain. Origin, Evolution and Current Situation; Natural Áreas). *Retos* **2018**, *33*, 123–128, doi:10.47197/RETOS.V0I33.56462.
109. Crs -Maratón, P.; Trinidad, V.; Edp, A. *PROYECTO CRS Corre/recupera/repite/siempre/saludable MEMORIA FINAL*;
110. Jimenez, C. (runnersworld) Endorfinas: La Sustancia de Tu Cuerpo Que Te Engancha a Correr y No Puedas Parar de Hacer Kilómetros Available online: <https://www.runnersworld.com/es/salud-lesiones-runner/a29395585/endorfinas-efectos-correr-cuerpo/>.
111. Martínez-Navarro, I.; Sanchez-Gómez, J.M.; Aparicio, I.; Priego-Quesada, J.I.; Pérez-Soriano, P.; Collado, E.; Hernando, B.; Hernando, C. Effect of Mountain Ultramarathon Distance Competition on Biochemical Variables, Respiratory and Lower-Limb Fatigue. *PLoS One* **2020**, *15*, doi:10.1371/journal.pone.0238846.
112. Martínez-Navarro, I.; Aparicio, I.; Priego-Quesada, J.I.; Pérez-Soriano, P.;

- Collado, E.; Hernando, B.; Hernando, C. Effects of Wearing a Full Body Compression Garment during Recovery from an Ultra-Trail Race. *Eur. J. Sport Sci.* **2021**, *21*, 811–818, doi:10.1080/17461391.2020.1783369.
113. Hernando, C.; Hernando, C.; Martinez-Navarro, I.; Collado-Boira, E.; Panizo, N.; Hernando, B. Using Accelerometry for Evaluating Energy Consumption and Running Intensity Distribution throughout a Marathon According to Sex. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 1–14, doi:10.3390/ijerph17176196.
114. Martinez-Navarro, I.; Collado, E.; Hernando, B.; Hernando, C. Pulmonary and Inspiratory Muscle Function Response to a Mountain Ultramarathon. *J. Sport. Sci. Med.* **2021**, *20*, 706–713, doi:10.52082/jssm.2021.706.
115. Martinez-Navarro, I.; Montoya-Vieco, A.; Collado, E.; Hernando, B.; Hernando, C. Inspiratory and Lower-Limb Strength Importance in Mountain Ultramarathon Running. Sex Differences and Relationship with Performance. *Sport. (Basel, Switzerland)* **2020**, *8*, 134, doi:10.3390/sports8100134.
116. Hernando, C.; Hernando, C.; Collado, E.J.; Panizo, N.; Martinez-Navarro, I.; Hernando, B. Establishing Cut-Points for Physical Activity Classification Using Triaxial Accelerometer in Middle-Aged Recreational Marathoners. *PLoS One* **2018**, *13*, doi:10.1371/journal.pone.0202815.
117. Hattori, N.; Hayashi, T.; Nakachi, K.; Ichikawa, H.; Goto, C.; Tokudome, Y.; Kuriki, K.; Hoshino, H.; Shibata, K.; Yamada, N.; et al. Changes of ROS during a Two-Day Ultra-Marathon Race. *Int. J. Sports Med.* **2009**, *30*, 426–429, doi:10.1055/s-0028-1112144.
118. Ji, L.L. Exercise at Old Age: Does It Increase or Alleviate Oxidative Stress? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *928*, 236–247, doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb05653.x.
119. Quindry, J.C.; McAnulty, S.R.; Hudson, M.B.; Hosick, P.; Dumke, C.; McAnulty, L.S.; Henson, D.; Morrow, J.D.; Nieman, D. Oral Quercetin Supplementation and Blood Oxidative Capacity in Response to Ultramarathon Competition. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2008**, *18*, 601–616, doi:10.1123/ijsnem.18.6.601.

120. Panizo González, N.; Reque Santivañez, J.E.; Hernando Fuster, B.; Collado Boira, E.J.; Martinez-Navarro, I.; Chiva Bartoll, Ó.; Hernando Domingo, C. Quick Recovery of Renal Alterations and Inflammatory Activation after a Marathon. *Kidney Dis.* **2019**, *5*, 259–265, doi:10.1159/000500510.
121. Wołyniec, W.; Ratkowski, W.; Kasprowicz, K.; Małgorzewicz, S.; Aleksandrowicz, E.; Zdrojewski, T.; Wierucki, Ł.; Puch-Walczak, A.; Żmijewski, P.; Renke, M. Factors Influencing Post-Exercise Proteinuria after Marathon and Ultramarathon Races. *Biol. Sport* **2020**, *37*, 33–40, doi:10.5114/biol sport.2020.89939.
122. Alonso, I.; Matos, A.; Ribeiro, R.; Gil, Ąngela; Cardoso, C.; Sardinha, L.B.; Bicho, M. Mountain Cycling Ultramarathon Effects on Inflammatory and Hemoglobin Responses. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2018**, *50*, 353–360, doi:10.1249/MSS.0000000000001440.
123. Giandolini, M.; Gimenez, P.; Temesi, J.; Arnal, P.J.; Martin, V.; Rupp, T.; Morin, J.B.; Samozino, P.; Millet, G.Y. Effect of the Fatigue Induced by a 110-Km Ultramarathon on Tibial Impact Acceleration and Lower Leg Kinematics. *PLoS One* **2016**, *11*, e0151687, doi:10.1371/journal.pone.0151687.
124. Mastaloudis, A.; Morrow, J.D.; Hopkins, D.W.; Devaraj, S.; Traber, M.G. Antioxidant Supplementation Prevents Exercise-Induced Lipid Peroxidation, but Not Inflammation, in Ultramarathon Runners. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 1329–1341, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.02.069.
125. Tomaszewski, M.; Charchar, F.J.; Przybycin, M.; Crawford, L.; Wallace, A.M.; Gosek, K.; Lowe, G.D.; Zukowska-Szczechowska, E.; Grzeszczak, W.; Sattar, N.; et al. Strikingly Low Circulating CRP Concentrations in Ultramarathon Runners Independent of Markers of Adiposity: How Low Can You Go? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 1640–1644, doi:10.1161/01.ATV.0000087036.75849.0B.
126. Skenderi, K.P.; Tsironi, M.; Lazaropoulou, C.; Anastasiou, C.A.; Matalas, A.L.;

- Kanavaki, I.; Thalmann, M.; Goussetis, E.; Papassotiriou, I.; Chrousos, G.P. Changes in Free Radical Generation and Antioxidant Capacity during Ultramarathon Foot Race. *Eur. J. Clin. Invest.* **2008**, *38*, 159–165, doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01917.x.
127. Spanidis, Y.; Stagos, D.; Orfanou, M.; Goutzourelas, N.; Bar-Or, D.; Spandidos, D.; Kouretas, D. Variations in Oxidative Stress Levels in 3 Days Follow-up in Ultramarathon Mountain Race Athletes. *J. Strength Cond. Res.* **2017**, *31*, 582–594, doi:10.1519/JSC.0000000000001584.
128. Turner, J.E.; Hodges, N.J.; Bosch, J.A.; Aldred, S. Prolonged Depletion of Antioxidant Capacity after Ultraendurance Exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2011**, *43*, 1770–1776, doi:10.1249/MSS.0B013E31821240BB.
129. Panizo González, N.; Reque Santivañez, J.E.; Hernando Fuster, B.; Collado Boira, E.J.; Martínez-Navarro, I.; Chiva Bartoll, Ó.; Hernando Domingo, C. Quick Recovery of Renal Alterations and Inflammatory Activation after a Marathon. *Kidney Dis.* **2019**, *5*, 259–265, doi:10.1159/000500510.
130. Martínez-Navarro, I.; Montoya-Vieco, A.; Hernando, C.; Hernando, B.; Panizo, N.; Collado, E. The Week after Running a Marathon: Effects of Running vs Elliptical Training vs Resting on Neuromuscular Performance and Muscle Damage Recovery. *Eur. J. Sport Sci.* **2021**, *0*, 1–16, doi:10.1080/17461391.2020.1857441.
131. Lawrence, R.A.; Parkhill, L.K.; Burk, R.F. Hepatic Cytosolic Non Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase Activity: Its Nature and the Effect of Selenium Deficiency. *J. Nutr.* **1978**, *108*, 981–987, doi:10.1093/jn/108.6.981.
132. Smith, I.K.; Vierheller, T.L.; Thorne, C.A. Assay of Glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates Using 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic Acid). *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 408–413.
133. Richard, M.J.; Guiraud, P.; Meo, J.; Favier, A. High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Malondialdehyde—Thiobarbituric Acid Adduct in Biological Materials (Plasma and Human Cells) Using a Commercially Available

- Reagent. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1992**, 577, 9–18,  
doi:[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80593-F](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80593-F).
134. Lykkesfeldt, J. Determination of Malondialdehyde as Dithiobarbituric Acid Adduct in Biological Samples by HPLC with Fluorescence Detection: Comparison with Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. *Clin. Chem.* **2001**, 47, 1725–1727.
135. Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 464–478, doi:10.1016/0076-6879(90)86141-H.
136. Tian, L.; Cai, Q.; Wei, H. Alterations of Antioxidant Enzymes and Oxidative Damage to Macromolecules in Different Organs of Rats during Aging. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1477–1484.
137. Martínez-Navarro, I.; Chiva-Bartoll, O.; Hernando, B.; Collado, E.; Porcar, V.; Hernando, C. Hydration Status, Executive Function, and Response to Orthostatism after a 118-Km Mountain Race: Are They Interrelated? *J. Strength Cond. Res.* **2018**, 32, 441–449, doi:10.1519/JSC.0000000000001614.
138. Mohd Razali, N.; Bee Wah, Y. *Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests*; 2011; Vol. 2; ISBN 978-967-363-157-5.
139. Magis, D.; Facon, B. Angoff's Delta Method Revisited: Improving DIF Detection under Small Samples. *Br. J. Math. Stat. Psychol.* **2012**, 65, 302–321, doi:10.1111/j.2044-8317.2011.02025.x.
140. Stoica, P.; Söderström, T. On the Parsimony Principle. *Int. J. Control* **1982**, 36, 409–418, doi:10.1080/00207178208932904.
141. Williams, M.; Alberto, C.; Grajales, G. Assumptions of Multiple Regression: Correcting Two Misconceptions - Practical Assessment, Research & Evaluation. *Evaluación práctica, Investig. y evaluación* **2013**, 18.

142. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*; 2013; ISBN 0805802835.
143. André, C.; Girard, J.; Gautier, S.; Derambure, P.; Rochoy, M. Training Modalities and Self-Medication Behaviors in a Sample of Runners during an Ultra Trail. *Sci. Sports* **2020**, *35*, 48.e1-48.e7, doi:<https://doi.org/10.1016/j.scispo.2019.04.007>.
144. Zillmann, T.; Knechtle, B.; Rüst, C.A.; Knechtle, P.; Rosemann, T.; Lepers, R. Comparison of Training and Anthropometric Characteristics between Recreational Male Half-Marathoners and Marathoners. *Chin. J. Physiol.* **2013**, *56*, 121–129, doi:10.4077/CJP.2013.BAB105.
145. Rüst, C.A.; Knechtle, B.; Knechtle, P.; Wirth, A.; Rosemann, T. Body Mass Change and Ultra Endurance Performance: A Decrease in Body Mass Is Associated with an Increased Running Speed in Male 100-Km Ultra Marathoners. *J. Strength Cond. Res.* **2012**, *26*, 1505–1516, doi:10.1519/JSC.0b013e318231a7b5.
146. Kim, Y.J.; Park, K.M. Effects of Super-Ultramarathon Running on Cardiac Structure and Function in Middle-Aged Men. *J. Cardiovasc. Imaging* **2020**, *28*, 202–210, doi:10.4250/jcvi.2020.0020.
147. Skenderi, K.P.; Tsironi, M.; Lazaropoulou, C.; Anastasiou, C.A.; Matalas, A.-L.; Kanavaki, I.; Thalmann, M.; Goussetis, E.; Papassotiriou, I.; Chrousos, G.P. Changes in Free Radical Generation and Antioxidant Capacity during Ultramarathon Foot Race. *Eur. J. Clin. Invest.* **2008**, *38*, 159–165, doi:10.1111/J.1365-2362.2007.01917.X.
148. Besson, T.; Morio, C.; Millet, G.Y.; Rossi, J. Influence of Shoe Drop on Running Kinematics and Kinetics in Female Runners. *Eur. J. Sport Sci.* **2019**, *19*, 1320–1327, doi:10.1080/17461391.2019.1603327.
149. Knechtle, B.; Knechtle, P.; Rosemann, T. Do Male 100-Km Ultra-Marathoners Overdrink? *Int. J. Sports Physiol. Perform.* **2011**, *6*, 195–207, doi:10.1123/IJSP.6.2.195.
150. Picco, J.M.; Wolff, S.; González-Dávila, E.; Wolff, D. Pre-and Post-Endurance

- Exercise Gender Differences between Ultra Marathon Athletes. *Rev. Argent. Cardiol.* **2021**, *89*, 13–19, doi:10.7775/rac.v89.i1.19245.
151. Kikuno, N.; Shiina, H.; Urakami, S.; Kawamoto, K.; Hirata, H.; Tanaka, Y.; Majid, S.; Igawa, M.; Dahiya, R. Genistein Mediated Histone Acetylation and Demethylation Activates Tumor Suppressor Genes in Prostate Cancer Cells. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 552–560, doi:10.1002/IJC.23590.
152. Cejka, N.; Rüst, C.A.; Lepers, R.; Onywera, V.; Rosemann, T.; Knechtle, B. Participation and Performance Trends in 100-Km Ultra-Marathons Worldwide. *J. Sports Sci.* **2014**, *32*, 354–366, doi:10.1080/02640414.2013.825729.
153. Suter, D.; Sousa, C.V.; Hill, L.; Scheer, V.; Nikolaidis, P.T.; Knechtle, B. Even Pacing Is Associated with Faster Finishing Times in Ultramarathon Distance Trail Running— the “Ultra-Trail Du Mont Blanc” 2008–2019. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 1–11, doi:10.3390/ijerph17197074.
154. Knechtle, B.; Nikolaidis, P.T. Physiology and Pathophysiology in Ultra-Marathon Running. *Front. Physiol.* 2018, *9*.
155. Knechtle, B.; Jastrzebski, Z.; Rosemann, T.; Nikolaidis, P.T. Pacing During and Physiological Response After a 12-Hour Ultra-Marathon in a 95-Year-Old Male Runner. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1875, doi:10.3389/fphys.2018.01875.
156. Ahmadyar, B.; Rüst, C.A.; Rosemann, T.; Knechtle, B. Participation and Performance Trends in Elderly Marathoners in Four of the World’s Largest Marathons during 2004–2011. *Springerplus* **2015**, *4*, doi:10.1186/S40064-015-1254-6.
157. Rüst, C.A.; Knechtle, B.; Knechtle, P.; Rosemann, T. Similarities and Differences in Anthropometry and Training between Recreational Male 100-Km Ultra-Marathoners and Marathoners. *J. Sports Sci.* **2012**, *30*, 1249–1257, doi:10.1080/02640414.2012.697182.
158. Hoffman, M.D.; Krishnan, E. Health and Exercise-Related Medical Issues among 1,212 Ultramarathon Runners: Baseline Findings from the Ultrarunners

- Longitudinal TRacking (ULTRA) Study. *PLoS One* **2014**, *9*,  
doi:10.1371/journal.pone.0083867.
159. Jörres, M.; Gunga, H.-C.; Steinach, M. Physiological Changes, Activity, and Stress During a 100-Km–24-h Walking-March. *Front. Physiol.* **2021**, *12*,  
doi:10.3389/fphys.2021.640710.
160. Khodaei, M.; Spittler, J.; Vanbaak, K.; Changstrom, B.G.; Hill, J.C. Effects of Running an Ultramarathon on Cardiac, Hematologic, and Metabolic Biomarkers. *Int. J. Sports Med.* **2015**, *36*, 867–871, doi:10.1055/s-0035-1550045.
161. Martínez-Navarro, I.; Collado, E.; Hernando, C.; Hernando, B.; Hernando, C. Inflammation, Muscle Damage and Post-race Physical Activity Following a Mountain Ultramarathon. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **2021**, *61*, 1668–1674,  
doi:10.23736/S0022-4707.21.11977-2.
162. Chiva-Bartoll, O. Evolución De La Masa Corporal, La Altura Y El Imc En Evolution of the Body Mass, Height and Bmi in Participants of the Ultra-Trail Csp-115. *J Sport Heal. Res J. Sport Heal. Res.* **2016**, *8*, 215–222.
163. GY Millet, J.B.H.K.J.M.L.V.C.E.A.G.L.F. Physiological and Biological Factors Associated with a 24 h Treadmill Ultra-Marathon Performance. *Scand J Med Sci Sport.* **2011**, *21*, 54–61, doi:10.1111/j.1600-0838.2009.01001.x.
164. Reuter, S.E.; Evans, A.M. Long-Chain Acylcarnitine Deficiency in Patients with Chronic Fatigue Syndrome. Potential Involvement of Altered Carnitine Palmitoyltransferase-I Activity. *J. Intern. Med.* **2011**, *270*, 76–84,  
doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02341.x.
165. Saugy, J.; Place, N.; Millet, G.Y.; Degache, F.; Schena, F.; Millet, G.P. Alterations of Neuromuscular Function after the World’s Most Challenging Mountain Ultra-Marathon. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0065596.
166. Martínez-Navarro, I.; Montoya-Vieco, A.; Collado, E.; Hernando, B.; Hernando, C. Ultra Trail Performance Is Differently Predicted by Endurance Variables in Men and Women. *Int. J. Sports Med.* **2020**, doi:10.1055/a-1255-3083.

167. Tiller, N.B. Pulmonary and Respiratory Muscle Function in Response to Marathon and Ultra-Marathon Running: A Review. *Sport. Med.* **2019**, *49*, 1031–1041, doi:10.1007/s40279-019-01105-w.
168. Knechtle, B.; Nikolaidis, P.T. Physiology and Pathophysiology in Ultra-Marathon Running. *Front. Physiol.* 2018, *9*.
169. Hoffman, M.D.; Ong, J.C.; Wang, G. Historical Analysis of Participation in 161 Km Ultramarathons in North America. *Int. J. Hist. Sport* **2010**, *27*, 1877–1891, doi:10.1080/09523367.2010.494385.
170. Knechtle, B.; Nikolaidis, P.T.; Zingg, M.A.; Rosemann, T.; Rüst, C.A. Half-Marathoners Are Younger and Slower than Marathoners. *Springerplus* **2016**, *5*, 1–16, doi:10.1186/s40064-016-1704-9.
171. Bernat-Adell, M.D.; Collado-Boira, E.J.; Moles-Julio, P.; Panizo-González, N.; Martínez-Navarro, I.; Hernando-Fuster, B.; Hernando-Domingo, C. Recovery of Inflammation, Cardiac, and Muscle Damage Biomarkers After Running a Marathon. *J. Strength Cond. Res.* **2019**, *1*, doi:10.1519/jsc.00000000000003167.
172. Lippi, G.; Targher, G.; Montagnana, M.; Salvagno, G.L.; Zoppini, G.; Guidi, G.C. Relation between Red Blood Cell Distribution Width and Inflammatory Biomarkers in a Large Cohort of Unselected Outpatients. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, *133*, 628–632, doi:10.5858/133.4.628.
173. Kupchak, B.R.; Kraemer, W.J.; Hoffman, M.D.; Phinney, S.D.; Volek, J.S. The Impact of an Ultramarathon on Hormonal and Biochemical Parameters in Men. *Wilderness Environ. Med.* **2014**, *25*, 278–288, doi:10.1016/j.wem.2014.03.013.
174. Millet, G.Y.; Tomazin, K.; Verges, S.; Vincent, C.; Bonnefoy, R.; Boisson, R.C.; Gergelé, L.; Féasson, L.; Martin, V. Neuromuscular Consequences of an Extreme Mountain Ultra-Marathon. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0017059.
175. Hoppel, F.; Calabria, E.; Pesta, D.; Kantner-Rumplmair, W.; Gnaiger, E.; Bartscher, M. Physiological and Pathophysiological Responses to Ultramarathon Running in Non-Elite Runners. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1300,

doi:10.3389/fphys.2019.01300.

176. Rubio-Arias, J.; Ávila-Gandía, V.; López-Román, F.J.; Soto-Méndez, F.; Alcaraz, P.E.; Ramos-Campo, D.J. Muscle Damage and Inflammation Biomarkers after Two Ultra-Endurance Mountain Races of Different Distances: 54 km vs 111 km. *Physiol. Behav.* **2019**, *205*, 51–57, doi:10.1016/j.physbeh.2018.10.002.
177. Kim, T.K.; Thomas, S.M.; Ho, M.; Sharma, S.; Reich, C.I.; Frank, J.A.; Yeater, K.M.; Biggs, D.R.; Nakamura, N.; Stumpf, R.; et al. Heterogeneity of Vaginal Microbial Communities within Individuals. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 1181–1189.
178. Waśkiewicz, Z.; Kápcińska, B.; Sadowska-Krępa, E.; Czuba, M.; Kempa, K.; Kimsa, E.; Gerasimuk, D. Acute Metabolic Responses to a 24-h Ultra-Marathon Race in Male Amateur Runners. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2012**, *112*, 1679–1688, doi:10.1007/S00421-011-2135-5.
179. Tiller, N.B.; Roberts, J.D.; Beasley, L.; Chapman, S.; Pinto, J.M.; Smith, L.; Wiffin, M.; Russell, M.; Sparks, S.A.; Duckworth, L.; et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: Nutritional Considerations for Single-Stage Ultra-Marathon Training and Racing. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2019**, *16*, doi:10.1186/s12970-019-0312-9.
180. Turner, J.E.; Bennett, S.J.; Bosch, J.A.; Griffiths, H.R.; Aldred, S. Ultra-Endurance Exercise: Unanswered Questions in Redox Biology and Immunology. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 989–995, doi:10.1042/BST20140120.
181. Knez, W.L.; Jenkins, D.G.; Coombes, J.S. Oxidative Stress in Half and Full Ironman Triathletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2007**, *39*, 283–288, doi:10.1249/01.mss.0000246999.09718.0c.
182. Neubauer, O.; Sabapathy, S.; Ashton, K.J.; Desbrow, B.; Peake, J.M.; Lazarus, R.; Wessner, B.; Cameron-Smith, D.; Wagner, K.H.; Haseler, L.J.; et al. Time Course-Dependent Changes in the Transcriptome of Human Skeletal Muscle during Recovery from Endurance Exercise: From Inflammation to Adaptive Remodeling.

- J. Appl. Physiol.* **2014**, *116*, 274–287, doi:10.1152/jappphysiol.00909.2013.
183. Turner, J.E.; Bosch, J.A.; Aldred, S. Measurement of Exercise-Induced Oxidative Stress in Lymphocytes. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 1299–1304, doi:10.1042/BST0391299.
184. Spanidis, Y.; Stagos, D.; Orfanou, M.; Goutzourelas, N.; Bar-Or, D.; Spandidos, D.; Kouretas, D. Variations in Oxidative Stress Levels in 3 Days Follow-up in Ultramarathon Mountain Race Athletes. *J. Strength Cond. Res.* **2017**, *31*, 582–594, doi:10.1519/JSC.0000000000001584.
185. Kabasakalis, A.; Kyparos, A.; Tsalis, G.; Loupos, D.; Pavlidou, A.; Kouretas, D. Blood Oxidative Stress Markers after Ultramarathon Swimming. *J. Strength Cond. Res.* **2011**, *25*, 805–811, doi:10.1519/JSC.0B013E3181D0B109.
186. Brigelius-Flohé, R.; Kipp, A.P. Physiological Functions of GPx2 and Its Role in Inflammation-Triggered Carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1259*, 19–25, doi:https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06574.x.
187. Arribas, L.; Almansa, I.; Miranda, M.; Muriach, M.; Romero, F.J.; Villar, V.M. Serum Malondialdehyde Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in a Longitudinal Study of Gestational Diabetes. *PLoS One* **2016**, *11*, e0155353.
188. Sánchez-Vallejo, V.; Benlloch-Navarro, S.; Trachsel-Moncho, L.; López-Pedrajas, R.; Almansa, I.; Romero, F.J.; Miranda, M. Alterations in Glutamate Cysteine Ligase Content in the Retina of Two Retinitis Pigmentosa Animal Models. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *96*, 245–254, doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.04.195.
189. Beltrán-Sarmiento, E.; Arregoitia-Sarabia, C.K.; Floriano-Sánchez, E.; Sandoval-Pacheco, R.; Galván-Hernández, D.E.; Coballase-Urrutia, E.; Carmona-Aparicio, L.; Ramos-Reyna, E.; Rodríguez-Silverio, J.; Cárdenas-Rodríguez, N. Effects of Valproate Monotherapy on the Oxidant-Antioxidant Status in Mexican Epileptic Children: A Longitudinal Study. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 7954371, doi:10.1155/2018/7954371.

190. NEUBAUER, O.; KÖNIG, D.; KERN, N.; NICS, L.; WAGNER, K.-H. No Indications of Persistent Oxidative Stress in Response to an Ironman Triathlon. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **2008**, *40*.
191. Kłapcińska, B.; Waśkiewicz, Z.; Chrapusta, S.; Sadowska-Krępa, E.; Czuba, M.; Langfort, J. Metabolic Responses to a 48-h Ultra-Marathon Run in Middle-Aged Male Amateur Runners. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **2013**, *113*, 2781, doi:10.1007/s00421-013-2714-8.
192. Tsuru-Aoyagi, K.; Potts, M.B.; Trivedi, A.; Pfankuch, T.; Raber, J.; Wendland, M.; Claus, C.P.; Koh, S.E.; Ferriero, D.; Noble-Haeusslein, L.J. Glutathione Peroxidase Activity Modulates Recovery in the Injured Immature Brain. *Ann. Neurol.* **2009**, *65*, 540–549, doi:10.1002/ANA.21600.
193. Finkler, M.; Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. The Relationship between Oxidative Stress and Exercise. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **2014**, *25*, 1–11, doi:10.1515/jbcpp-2013-0082.
194. Somani, S.M.; Frank, S.; Rybak, L.P. Responses of Antioxidant System to Acute and Trained Exercise in Rat Heart Subcellular Fractions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1995**, *51*, 627–634, doi:10.1016/0091-3057(94)00427-K.
195. Benedetti, S.; Catalani, S.; Peda, F.; Luchetti, F.; Citarella, R.; Battistelli, S. Impact of the 24-h Ultramarathon Race on Homocysteine, Oxidized Low-Density Lipoprotein, and Paraoxonase 1 Levels in Professional Runners. *PLoS One* **2018**, *13*, doi:10.1371/journal.pone.0192392.
196. Devrim-Lanpir, A.; Bilgic, P.; Kocahan, T.; Deliceoğlu, G.; Rosemann, T.; Knechtle, B. Total Dietary Antioxidant Intake Including Polyphenol Content: Is It Capable to Fight against Increased Oxidants within the Body of Ultra-Endurance Athletes? *Nutrients* **2020**, *12*, 1–16, doi:10.3390/NU12061877.
197. Ginsburg, G.S.; Agil, A.; O'Toole, M.; Rimm, E.; Douglas, P.S.; Rifai, N. Effects of a Single Bout of Ultraendurance Exercise on Lipid Levels and Susceptibility of Lipids to Peroxidation in Triathletes. *JAMA* **1996**, *276*, 221–225,

doi:10.1001/jama.1996.03540030055032.

198. Nieman, D.C.; Dumke, C.I.; Henson, D.A.; McAnulty, S.R.; McAnulty, L.S.; Lind, R.H.; Morrow, J.D. Immune and Oxidative Changes during and Following the Western States Endurance Run. *Int. J. Sports Med.* **2003**, *24*, 541–547, doi:10.1055/S-2003-42018/ID/34.
199. Miyata, M.; Kasai, H.; Kawai, K.; Yamada, N.; Tokudome, M.; Ichikawa, H.; Goto, C.; Tokudome, Y.; Kuriki, K.; Hoshino, H.; et al. Changes of Urinary 8-Hydroxydeoxyguanosine Levels during a Two-Day Ultramarathon Race Period in Japanese Non-Professional Runners. *Int J Sport. Med* **2008**, *29*, 27–33, doi:10.1055/s-2007-965072.

## 8. ANEXOS



## Anexo nº1. Aprobación Comité Ético





Beatriz Tomás Mallén, secretaria de la Comisión Deontológica de la Universitat Jaume I de Castelló de la Plana,

CERTIFICO: Que la Comisión Deontológica de la Universitat Jaume I ha emitido informe FAVORABLE sobre el proyecto con número de expediente CD/007/2019 "Penyagolosa Trail Saludable Women (PTSW)" cuyo personal investigador principal es Carlos Hernando Domingo, por considerar que cumple las normas deontológicas exigidas.

Castellón de la Plana, 6 de març de 2019



Anexo nº2. Autorización para la realización de la Investigación.





COMISSIÓ DEONTOLÒGICA

Sol·licitud i autorització  
de la institució

**Dades personals**

Nom i cognoms: Carlos Hernando Domingo

DNI: 18923254G

Nom del projecte: Penyagolosa Trail Saludable Women (PTSW)

Com a investigador/a principal del projecte,

**SOL·LICITE:** Que el vostre centre/hospital/institució Club Esportiu Marató i Mitja Castelló-Penyagolosa

em concedisca l'autorització per realitzar-hi les investigacions següents:

Seguimiento del estado de salud, de condición física y los cambios producidos por la realización de un esfuerzo de larga duración en montaña de los corredores participantes en la Penyagolosa Trails<sup>®</sup> CSP que se incluyan en la investigación del Proyecto Penyagolosa Trail Saludable Women

(Firma)

Castelló de la Plana, 5 d febrer de 2019

**Dades de l'organisme**

Centre/hospital/institució: Club Esportiu Marató i Mitja

Nom i cognoms: Vicente Cervera Mateu

DNI: 18936965F

Car. a (càrrec): President

**AUTORITZE:** La investigació sol·licitada més amunt.

(Segell i firma)

Castelló de la Plana, 5 de febrer de 2019



### Anexo nº 3. Hoja de consentimiento informado



**Datos personales**

Nombre y apellidos \_\_\_\_\_ DNI \_\_\_\_\_

Proyecto de investigación *Penyagolosa Trail Saludable Women (PTSW)*

Investigador/a principal del proyecto *Carlos Hernando Domingo*

**MANIFIESTO**

*He sido informado de que el Grupo de Investigación en Proyectos de investigación saludable - Servei d'Esports de la Universitat Jaume I llevara a término el tratamiento de mis datos personales de acuerdo con el Reglamento General de Protección de Datos (UE) 2016/679*

*Que he sido informado/a suficientemente de las pruebas y tratamientos que recibiré como consecuencia de la investigación que se practica.*

*Que estoy de acuerdo y acepto libre y voluntariamente recibir única y exclusivamente este tratamiento y me comprometo a seguir las prescripciones y a formalizar los cuestionarios que se presenten.*

*Que puedo abandonar el tratamiento/colaboración en el momento que lo desee.*

*Que, salvaguardando siempre el derecho a la intimidad, acepto que los datos que se puedan derivar de esta investigación puedan ser utilizados para la divulgación científica.*

*Que los datos incluidos en este formulario, junto con el resto de informaciones que son objeto del proyecto, se incluirán al fichero *Proyectos de investigación saludable-Servei d'Esports UJI*, cuyo responsable es el grupo de investigación en proyectos de investigación saludable- Servicio de Deportes UJI de la Universitat Jaume I, con la finalidad de llevar a cabo el proyecto de investigación *Penyagolosa Trail Saludable Women**

*Que puedo ejercer los derechos que la ley me reserva ante el grupo de investigación en proyectos de investigación saludable- Servicio de Deportes UJI de la Universitat Jaume I. Universitat Jaume I. Avda de Vicent Sos Baynat, s/n E-12071. Castellón de la Plana, España. +34964729332, fax +34964728807. Correo electrónico [se@uji.es](mailto:se@uji.es).*

*Información básica sobre protección de datos*

*Responsable del tratamiento: Universitat Jaume I Servei d'Esports*

*Finalidad del tratamiento: Los proyectos de investigación saludable del Servicio de Deportes de la UJI pretenden profundizar en el mundo del deporte desde una vertiente saludable, entre otros, por las carreras de larga duración como son las pruebas de ultra resistencia por montaña o la especialidad del maratón.*

*Legitimación: Investigación científica.*

*Destinatarios: No se cederán datos a terceras partes salvo que sea obligación legal.*

*Derechos: Puede ejercer sus derechos de acceso, rectificación, supresión y portabilidad, y a la limitación o la oposición al tratamiento ante la Secretaría General de la Universitat Jaume I mediante el Registro Electrónico ([https://ujlapps.uji.es/reg/est/publicacion/solicitud\\_generica](https://ujlapps.uji.es/reg/est/publicacion/solicitud_generica)) o, presencialmente, en la Oficina de Información y Registro (InfoCampus), situada en el Ágora Universitaria - Locales 14-15. Puede consultar la información adicional y detallada sobre este tratamiento de datos en <https://www.uji.es/protecciondatos/clausules/?r=1003>*

*La persona interesada*

*El investigador/a principal del proyecto*

*(Firma) Nombre y apellidos*

*(Firma) Nombre y apellidos*

..... d ..... de 20.....



## Anexo nº 4. Publicación del Estudio





## Article

# Impact of Plasma Oxidative Stress Markers on Post-race Recovery in Ultramarathon Runners: A Sex and Age Perspective Overview

Carlos Guerrero <sup>1,†</sup> , Eladio Collado-Boira <sup>2,†</sup> , Ignacio Martínez-Navarro <sup>3,4</sup>, Barbara Hernando <sup>1</sup>, Carlos Hernando <sup>5,6</sup> , Pablo Balino <sup>1</sup> and María Muriach <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicine, Jaume I University, 12001 Castellon, Spain; cguerrer@uji.es (C.G.); hernandb@uji.es (B.H.); balino@uji.es (P.B.)

<sup>2</sup> Faculty of Health Sciences, Jaume I University, 12001 Castellon, Spain; colladoe@uji.es

<sup>3</sup> Department of Physical Education and Sport, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; ignacio.martinez-navarro@uv.es

<sup>4</sup> Sports Health Unit, Vithas-Nisa 9 de Octubre Hospital, 46001 Valencia, Spain

<sup>5</sup> Sport Service, Jaume I University, 12001 Castellon, Spain; hernando@uji.es

<sup>6</sup> Department of Education and Specific Didactics, Jaume I University, 12001 Castellon, Spain

\* Correspondence: muriach@uji.es

† Authors contributed equally to this work.



**Citation:** Guerrero, C.; Collado-Boira, E.; Martínez-Navarro, I.; Hernando, B.; Hernando, C.; Balino, P.; Muriach, M. Impact of Plasma Oxidative Stress Markers on Post-race Recovery in Ultramarathon Runners: A Sex and Age Perspective Overview. *Antioxidants* **2021**, *10*, 355. <https://doi.org/10.3390/antiox10030355>

Academic Editors: Gareth Davison and Conor McClean

Received: 21 January 2021

Accepted: 23 February 2021

Published: 27 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Oxidative stress has been widely studied in association to ultra-endurance sports. Although it is clearly demonstrated the increase in reactive oxygen species and free radicals after these extreme endurance exercises, the effects on the antioxidant defenses and the oxidative damage to macromolecules, remain to be fully clarified. Therefore, the aim of this study was to elucidate the impact of an ultramarathon race on the plasma markers of oxidative stress of 32 runners and their post-race recovery, with especial focused on sex and age effect. For this purpose, the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activity, as well as the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) and the carbonyl groups (CG) content were measured before the race, in the finish line and 24 and 48 h after the race. We have reported an increase of the oxidative damage to lipids and proteins (MDA and CG) after the race and 48 h later. Moreover, there was an increase of the GR activity after the race. No changes were observed in runners' plasma GPx activity throughout the study. Finally, we have observed sex and age differences regarding damage to macromolecules, but no differences were found regarding the antioxidant enzymes measured. Our results suggest that several basal plasma markers of oxidative stress might be related to the extent of muscle damage after an ultraendurance race and also might affect the muscle strength evolution.

**Keywords:** ultraendurance exercise; oxidative stress; antioxidants; muscle injury

## 1. Introduction

Ultramarathon races are defined as sport events that involve running and/or walking distances greater than the 42,195 km of a marathon. In the recent years, these short of competitive events have gained a lot of popularity. These extremely long races defiance our physiological systems inducing muscle injuries (muscle membrane disruption), respiratory fatigue, cardiac and renal damage, representing an outstanding model to evaluate the ultra-endurance exercises/sports on human body physiology [1–4].

Oxidative stress is defined as the imbalance between the body oxidants and antioxidants in favor of the former [5] and has been widely studied in association to ultra-endurance sports. However, although it is clearly demonstrated the increase in reactive oxygen species (ROS) and free radicals, the effects of these extreme endurance exercises on the cellular antioxidant defense system, and the oxidative damage to macromolecules, remain to be fully clarified [6]. In this regard, an increase in different plasmatic antioxidant

compounds such as glutathione (GSH), thioredoxin or paraoxonase, as well as in the total antioxidant capacity [7–10], supports the hypothesis of a compensatory mechanism to counteract the increased oxidative stress elicited by the intense exercise in these runners. Conversely, other researchers also showed contradictory and inconclusive results regarding the effects of intense activity on the antioxidant system. At this respect, several studies showed that the antioxidant system remained unchanged or even a decrease in several antioxidant molecules such as glutathione, catalase, or superoxide dismutase [11–14].

In this line of evidence, similar inconclusive results have been found regarding ultra-endurance activity effects on oxidative damage to macromolecules such as proteins, deoxyribonucleic acid (DNA) or lipids [15,16]. It has been demonstrated that the optimal muscle contractile function depends on the cellular redox state. However, the effects of ROS as well as several antioxidant compounds on contractile function during fatigue and recovery are still being debated [17,18].

Given this, the purpose of this study was to elucidate the impact of ultratrail endurance exercise on several plasma oxidative stress markers with especial focus on the post-race recovery. The objectives of this study are:

- i. To determine four plasma oxidative stress markers of long-distance amateur runners throughout the study. Two of them are macromolecule oxidative damage markers (MDA and CG) and the other two are antioxidant enzymes (GR and GPx).
- ii. To evaluate the influence of physical variables (sex and age) on these plasma oxidative stress markers after the race, 24 and 48 h afterwards.
- iii. To study the possible correlation between baseline values of these plasma oxidative stress markers and the post-race degree of systemic inflammatory processes, loss of skeletal muscle strength and muscle membrane disruption.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Participants

Forty-seven recreational ultra-endurance athletes (29 males and 18 females) were recruited to participate in the study that was developed at the Penyagolosa Trails CSP race in 2019. The track consisted of 107.4 km, starting at an altitude of 40 m and finishing at 1280 m above the sea level, with a total positive and negative elevation of 5604 and 4356 m respectively. All volunteers were fully informed of the procedure and gave their written consent to participate. They were also allowed to withdraw from the study at will. A questionnaire was used to collect demographic information, the history of training and competition and the consumption of antioxidant supplements in the preparation of the race and in the development of the same. The investigation was conducted according to the Declaration of Helsinki and approval for the project was obtained from the research Ethics Committee of the University Jaume I of Castellon (Expedient Number CD/007/2019). This study is enrolled in the ClinicalTrials.gov database, with the code number NCT03990259.

In order to have homogeneous groups, the participants were grouped by age as follows; under 38, between 38 and 45, and over 45 years.

### 2.2. Blood Sampling and Analysis

Blood samples were collected from an antecubital vein by venipuncture at the time of race number collection which was 8 to 6 h before the start, after crossing the finishing line, 24 and 48 h post-race using BD Vacutainer PST II tubes. Samples were centrifuged at 3500 rpm for ten minutes and kept at 4 °C during transport to Vithas Rey Don Jaime Hospital (Castellon), where they were processed using the modular platform Roche/Hitachi clinical chemistry analyzer Cobas c311 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany), as previously published [1,19]. Lactate dehydrogenase (LDH) and creatin kinase (CK) were used to assess muscle membrane disruption, as a surrogate for muscle damage. C-reactive protein (CRP) as an indicator of acute inflammatory reaction [3] (supplementary Table S1).

The oxidative stress biomarkers used in the present investigation were GR, GPx, MDA and CG, which were analyzed as follows:

GPx activity, which catalyzes the oxidation by  $H_2O_2$  of glutathione (GSH) to its disulfide (GSSG), was assayed spectrophotometrically as reported by Lawrence et al. [20] toward hydrogen peroxide, by monitoring the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm. The reaction mixture consisted of 240 mU/mL of GSH disulfide reductase, 1 mM GSH, 0.15 mM (NADPH) in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1 mM sodium molybdate; a 50  $\mu$ L sample was added to this mixture and allowed to equilibrate at 37 °C for 3 min. Reaction was started by the addition of hydrogen peroxide to adjust the final volume of the assay mixture to 1 mL.

GR activity was determined spectrophotometrically using Smith proposed method [21]. Briefly, when the GR catalyzed reduction of GSSG to GSH is produced in presence of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 2-nitrobenzoic acid is formed as a subproduct, which formation is monitored at 412 nm. The GSSG reduction was started by adding 25  $\mu$ L of brain sample to a solution containing DTNB 3 mM prepared in 10 mM phosphate buffer, 2 mM NADPH, 10 mM EDTA in 0.2 M pH 7.5 phosphate buffer.

MDA concentration was measured by liquid chromatography according to a modification of the method of Richard and coworkers [22], as previously reported [23]. Briefly, 0.1 mL of sample (or standard solutions prepared daily from 1,1,3,3-tetramethoxypropane) and 0.75 mL of working solution (thiobarbituric acid 0.37% and perchloric acid 6.4%; 2:1, v/v) were mixed and heated to 95 °C for 1 h. After cooling (10 min in ice water bath), the flocculent precipitate was removed by centrifugation at 3200  $\times$  g for 10 min. The supernatant was neutralized and filtered (0.22  $\mu$ m) prior to injection on an ODS 5  $\mu$ m column (250  $\times$  4.6 mm). Mobile phase consisted in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0): methanol (58:42, v/v). Isocratic separation was performed with 1.0 mL/min flow and detection at 532 nm.

CG were determined to evaluate protein oxidation in milk samples. The CGs released during incubation with 2,4-dinitrophenylhydrazine were measured using the method reported by Levine et al. (1990) [24] with some modifications introduced by Tiana et al. (1998) [25]. Briefly, the samples were centrifuged at 13,000  $\times$  g for 10 min. Then, 20 mL of brain homogenate was placed in a 1.5 mL Eppendorf tube, and 400  $\mu$ L of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine/2.5 M hydrochloric acid (HCl) and 400  $\mu$ L of 2.5 M HCl were added. This mixture was incubated for 1 h at room temperature. Protein precipitation was performed using 1 mL of 100% of TCA, washed twice with ethanol/ethyl acetate (1/1, v/v) and centrifuged at 12,600  $\times$  g for 3 min. Finally, 1.5 mL of 6 N guanidine, pH 2.3, was added, and the samples were incubated in a 37 °C water bath for 30 min and were centrifuged at 12,600  $\times$  g for 3 min. The carbonyl content was calculated from peak absorption (373 nm) using an absorption coefficient of 22,000  $M^{-1}cm^{-1}$  and was expressed as nmol/mg protein.

Biochemical results obtained immediately post-race were adjusted by employing the Dill and Costill method [26], using hematocrit and hemoglobin to determine the magnitude of plasma volume changes after the race in each participant.

### 2.3. Muscle Strength. Squat Jump (SJ) and Handgrip (HG) Strength Assessment

The SJ is a validated research test based on three parameters (body mass, jump height and push distance), which allows to accurately assess the strength, speed and power developed by the extensor muscles of the lower extremities during squat jumps [27].

Grip strength, short-term maximal voluntary force of the forearm muscles, measured by dynamometry, is well established as an indicator of muscle status [28]. Grip strength provides a direct measure of the hand skeletal muscle strength. It has been described as a strength index, endurance and general muscular status because its association between peripheral strength and exercise capacity [29].

Previous studies have also suggested that the strength decline index (SDI), calculated as the decline in strength as a proportion of baseline values, measured through tests such as the HG and SJ, is a useful assessment of muscle fatigue [30].

Volunteers were familiarized with procedures concerning strength assessment during an informative session prior to the investigation. HG and SJ tests were performed before the race and within 15 min after the race. In the HG assessment, volunteers remained in standing position, arm by their side with full elbow extension, holding the grip dynamometer (T.K.K. 5401 GRIP-D, Takei Scientific Instruments Co., Tokyo, Japan) in their dominant hand. They were asked to squeeze the dynamometer for 5 s and the test was performed twice, with 30 s of rest in between attempts. Each individual's peak value was retained for statistical analysis. Following previous studies [31,32], pre to post-race change in HG, given that upper-limb muscles could be considered as being hardly no-exercising muscles during the race. In the SJ assessment, participants were asked to jump as high as possible from a starting position with hips and knees flexed 80 degrees and hands stabilized on hips to avoid arm-swing. Jump height was estimated by the flight time measured with a contact platform (Chronojump, Barcelona, Spain). The test was performed twice, with 90 s of rest in between attempts. Each individual's best performance was retained for statistical analysis [3] (Supplementary Table S1).

#### 2.4. Basal Metabolic Rate (BMR), Body Mass Index (BMI), and Body Composition Assessment

Volunteers height and weight were measured before the start the day of the race. Participants were also subjected to a body composition evaluation test (Tanita BC-780MA, Tanita Corp., Tokyo, Japan). The BMR is defined as the daily rate of energy metabolism an individual needs to sustain in order to preserve the integrity of vital functions. The BMR formula ( $BMR = Kg \times 1 \text{ Kcal/h}$ ) was calculated based on previous studies [33].

#### 2.5. Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out using the Statistical Package for the Social Sciences software (IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0, IBM Corp., Armonk, NY). Normal distribution of the variables was verified through the Shapiro-Wilk test ( $p > 0.05$ ) [34].

A Pearson or Rho Spearman correlation analysis was used to assess whether the concentration of oxidative stress biomarkers (GR, GPX, MDA and CG) was interrelated or related to the loss of upper (HG) and lower limb (SJ) strength, hematologic variables of systemic inflammation (CRP) and muscle damage (CK, LDH), as well as cardiopulmonary exercise test results. Post-race and at 24 and 48 h values for these variables (GR, GPX, MDA, CG, HG, SJ, CRP, CK and LDH) for each participant were related to the individual pre-race level to define the delta scores ( $\Delta$ ):  $\Delta$  (fold increase) = (post-race value – Pre-race value)/Pre-race value [3].

On the other hand, the quantitative variables of oxidative stress were compared using the Student method Tests or U Mann Whitney in each of the sectors where measurements were taken (pre-race, finish line, 24 and 48 h after the race) when they existed two categories and ANOVA test or Kruskal Wallis when there were more categories. Post-hoc comparisons were performed using Bonferroni adjustment for multiple comparisons.

The meaningfulness of the outcomes was estimated through the partial estimated effect size ( $\eta^2$  partial) for ANOVA and Cohen's d effect size for pair wise comparisons. In the latter case, a Cohen's d < 0.5 was considered small; between 0.5–0.8, moderate; and greater than 0.8, large [35]. Likewise, correlations > 0.5 were considered strong, 0.3–0.5, moderate and <0.3, small. The significance level was set at  $p$ -value < 0.05 and data are presented as means and standard error of the means ( $\pm$ SEM).

Finally, the multiple regression analysis was performed using the forward stepwise method. Only normally distributed variables were used as dependent variables. Among the different models obtained, the parsimony principle was applied [36]. Given our limited sample size and the non-normal distribution of independent variables, residual errors from the resulting models were inspected to ensure their normal distribution and thus the reliability of our regression models [37]. To identify the predictive value of the model, the Cohen criterion [38] was applied to one-way ANOVA models. This criterion indicates that  $R^2$  values less than 0.10 do not present a relevant explanatory value; an  $R^2$  between 0.10

and 0.25 indicates a dependency of the analyzed variables variance explanation for the identified factors; and  $R^2$  values above 0.25 is possible to affirm that the explanatory model clinically relevant.

### 3. Results

#### 3.1. Demographic Characteristics of The Participants

Thirty-two runners reached the finish line. Nineteen were male and thirteen females, with an average finish time of 21 h 21 min  $\pm$  3 h 28 min. All levels of performance were represented in our sample, as shown by their rank, ranging from 7th to 32nd. The main characteristics of these runners are described in Table 1, including sex and age differences. As expected, males showed significant higher pre-race values in weight, BMR, BMI and percentage of muscular mass when compared with female runners. No differences were found in training characteristics or experience between male and female runners. The runner's age did not affect any of the parameters measured except for the weekly running volume that was smaller in the senior runner group.

**Table 1.** Baseline characteristics of the runners which completed the race by sex and age (Average  $\pm$  SE).

	Total (n = 32)	Males (n = 19)	Females (n = 13)	Young (n = 10)	Medium (n = 14)	Senior (n = 8)
Age (years)	40.9 $\pm$ 1.0	40.1 $\pm$ 1.2	42.2 $\pm$ 1.7	34.6 $\pm$ 0.6	41.4 $\pm$ 0.5	48 $\pm$ 1.1
Weight Pre-race (Kg)	66.1 $\pm$ 1.9	73.2 $\pm$ 1.5	55.7 $\pm$ 1.4 *	68.4 $\pm$ 2.9	63.1 $\pm$ 2.3	68.4 $\pm$ 5.1
BMR Pre-race (Kcal)	1619 $\pm$ 52	1835 $\pm$ 30	1302 $\pm$ 32 *	1708 $\pm$ 84	1563 $\pm$ 69	1604 $\pm$ 135
BMI Pre-race (kg/m <sup>2</sup> )	22.9 $\pm$ 0.4	23.8 $\pm$ 0.4	21.7 $\pm$ 0.6 *	23.2 $\pm$ 0.4	22.25 $\pm$ 0.5	23.8 $\pm$ 1.1
% Body Fatty Pre-race (%)	15.9 $\pm$ 1.1	12.4 $\pm$ 0.8	20.9 $\pm$ 1.2 *	14.3 $\pm$ 1.8	14.9 $\pm$ 1.2	19.5 $\pm$ 2.7
% Muscular Mass Pre-race (%)	84.1 $\pm$ 1.1	87.6 $\pm$ 0.8	79.1 $\pm$ 1.3 *	85.7 $\pm$ 1.8	85.1 $\pm$ 1.2	80.5 $\pm$ 2.7
Number of years running	8.0 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.6	8.1 $\pm$ 0.9	7.7 $\pm$ 1.0	7.7 $\pm$ 0.9	9.0 $\pm$ 1.0
Number of races > 100 km	2.5 $\pm$ 3.3	3.0 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 1.1	2 $\pm$ 1.1	2.4 $\pm$ 1.0	3.1 $\pm$ 0.5
Weekly training days	4.8 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 1.0
Weekly running volume (km)	70 $\pm$ 22	71 $\pm$ 5.8	74 $\pm$ 3.7	79.3 $\pm$ 8.4	73.4 $\pm$ 5.1	53.3 $\pm$ 4.5 #
Weekly positive elevation (m)	1771 $\pm$ 691	1869 $\pm$ 175	1631 $\pm$ 157	1600 $\pm$ 175	2057 $\pm$ 154	1488 $\pm$ 318
Weekly training hours	9.6 $\pm$ 4.2	10 $\pm$ 0.9	9 $\pm$ 1.3	10 $\pm$ 1.2	9.9 $\pm$ 1.2	8.6 $\pm$ 1.6

Data partially published previously by our group (Martinez-Navarro et al., 2020) [3]. Abbreviations: BMR: Basal Metabolic Rate; BMI: Body Mass Index. \*  $p < 0.05$  vs. Males; #  $p < 0.05$  vs. Young and Medium.

#### 3.2. Analysis of Plasma Markers of Oxidative Stress

Descriptive data of oxidative stress biomarkers pre-race (baseline), finish line and after 24 and 48 h post-race are depicted in Table 2. Regarding the antioxidant defenses, no significant changes were observed in GPx activity. The GR activity was significantly enhanced in the finish line. The GR enzymatic activity reached the highest value 24 h post-race and returned to normal values after 48 h. Lipid peroxidation (MDA concentration) was also increased in the finish line, declined 24 h post-race, and was significantly increased after 48 h. Oxidative damage to proteins (CG content) also increased immediately after the race and remained elevated 48 h later.

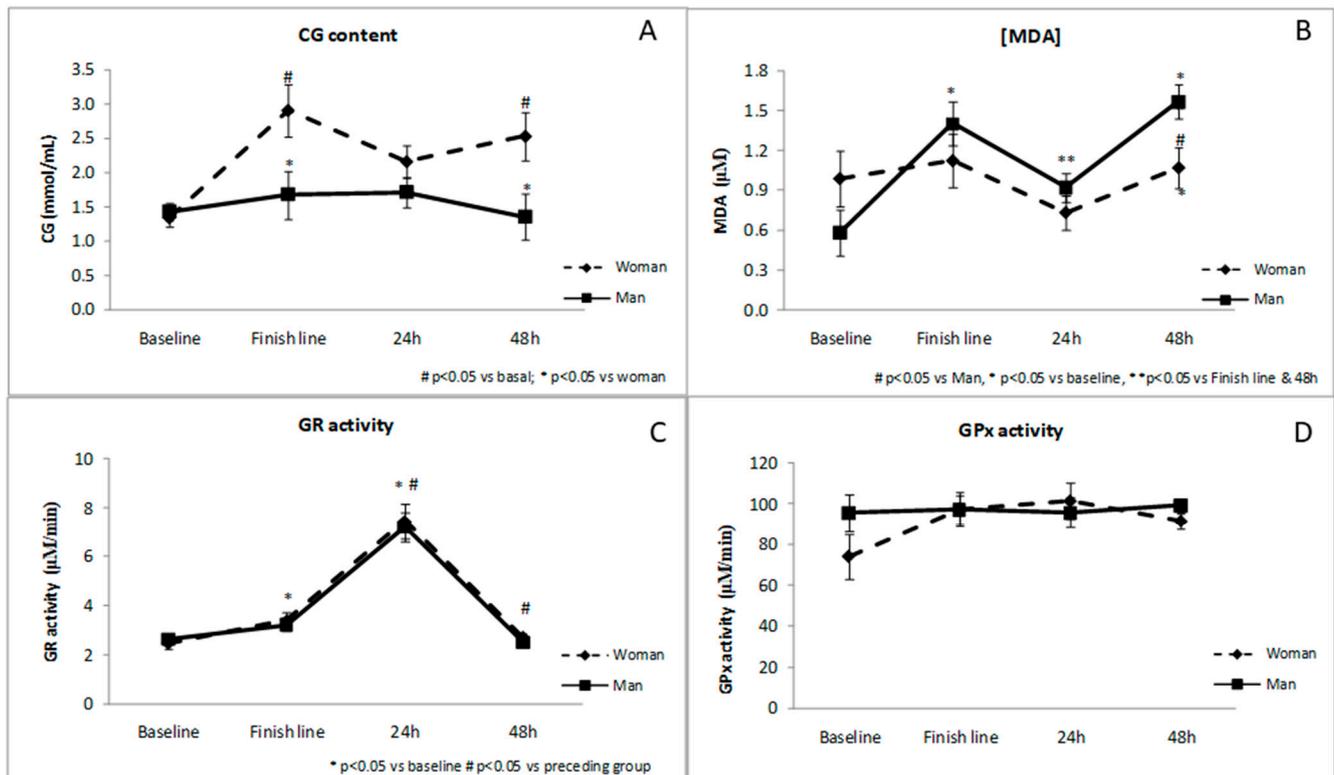
**Table 2.** Changes in plasma markers of oxidative stress throughout the study period (Average  $\pm$  SE).

	Baseline	Finish Line	24 H Post-Race	48 H Post-Race
GPx ( $\mu\text{mol/L} \times \text{min}$ )	87 $\pm$ 7	97 $\pm$ 5	98 $\pm$ 6	96 $\pm$ 3
GR (UI/mL)	2.6 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.2 #	7.3 $\pm$ 0.5 **	2.6 $\pm$ 0.1 *
MDA ( $\mu\text{M}$ )	0.8 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1 #	0.9 $\pm$ 0.1 *	1.4 $\pm$ 0.1 **
CG (nmol/mL)	1.4 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2 #	1.9 $\pm$ 0.2 #	2.1 $\pm$ 0.3 #

\*  $p < 0.05$  vs. preceding time point; #  $p < 0.05$  vs. baseline value.

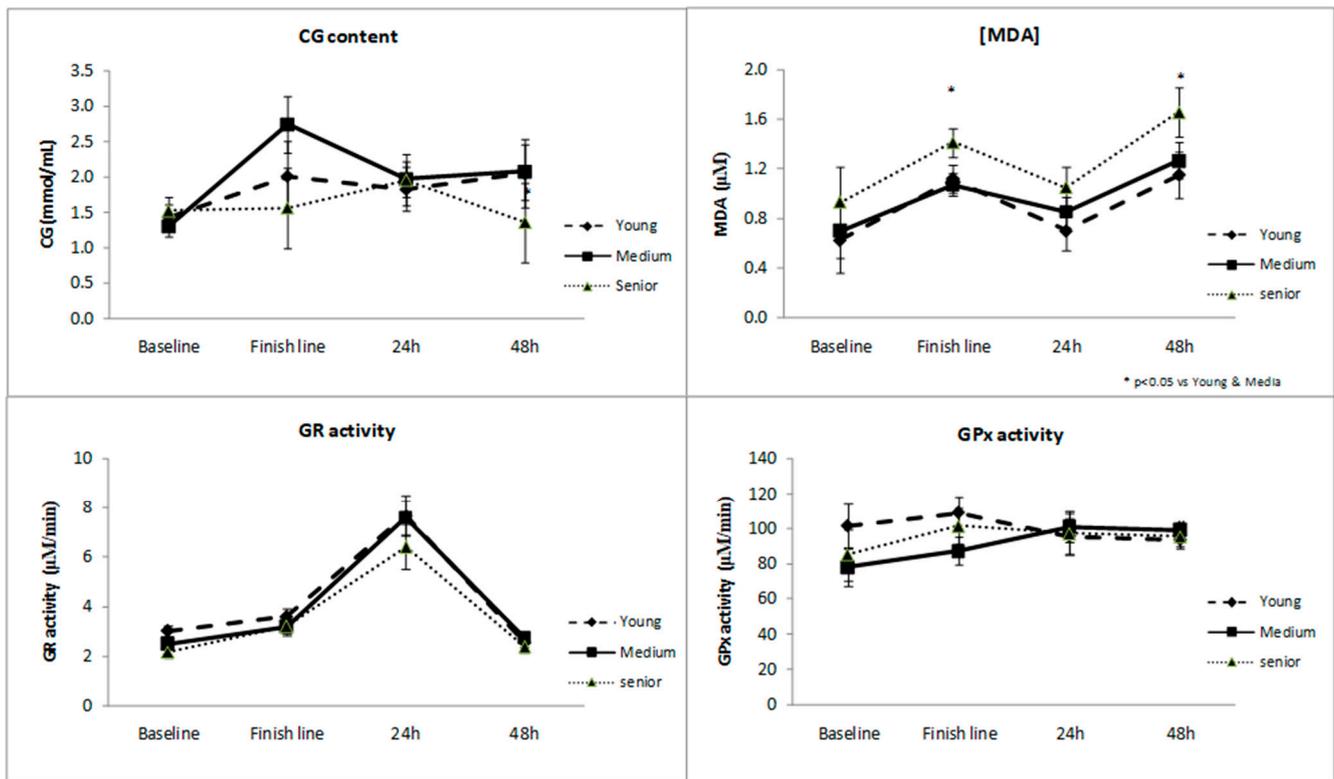
### 3.3. Influence of Sex and Age in the Plasma Markers of Oxidative Stress Evolution of the Runners

Data depicted in Figure 1, demonstrate that female runners have a significantly higher CG content when compared to males at the end of the race and 48 h later. To the contrary, MDA concentration 48 h post-race is higher in male compared to female runners. The antioxidant defenses, measured as GR and GPx enzymatic activity, are not conditioned by runner's sex.



**Figure 1.** Changes in plasma markers of oxidative status throughout the study according to runners' gender. CG (carbonyl groups) content (A), MDA (malondialdehyde) (B), GR (glutathione reductase) activity (C) and GPx (glutathione peroxidase) activity (D).

Data from Figure 2 shows the effect of the runner's age. A tendency can be observed in the plasma oxidative status of the senior runners which appears to be globally worse compared to the in the younger runner's values. Briefly, less antioxidant defenses and higher levels of oxidative damage to lipids and proteins. However, only the lipid peroxidation (MDA concentration) was significantly affected by the age. Thus, the MDA concentration was significantly higher in the senior runners when compared to the middle age and young competitors at the finish line and 48 h post-race.



**Figure 2.** Changes in plasma markers of oxidative status throughout the study according to runners' gender. CG (carbonyl groups) content (A), MDA (malondialdehyde) (B), GR (glutathione reductase) activity (C) and GPx (glutathione peroxidase) activity (D).

### 3.4. Correlation between the Plasma Markers of Oxidative Stress and the Skeletal Muscle Force Production, Muscle Damage and Systemic Inflammatory Response

Regarding the post-race skeletal muscle strength, Table 3 shows that there was significant negative correlation between basal MDA concentration and the fold increase in HG values in the finish line. We also observed a significant positive correlation between basal GR activity and the fold increase in SJ values at the finish line.

**Table 3.** Significant correlations between baseline plasma markers of oxidative stress and Delta values of muscle strength (SJ and HG) and muscle damage (CK and LDH).

	R Value	p Value
GR (UI/mL)/Δ SJ Finish line	0.405	0.027
GR (UI/mL)/Δ CK Finish line	−0.411	0.019
GR (UI/mL)/Δ ck 24/GR (UI/mL)	−0.352	0.048
GR (UI/mL)/Δ LDH Finish line	−0.402	0.023
GR (UI/mL)/Δ LDH 24	−0.418	0.017
GR (UI/mL)/Δ LDH	−0.406	0.021
GPx (μmol/L × min)/Δ CK 48	−0.360	0.043
CG (nmol/mL)/Δ LDH 24	0.358	0.048
CG (nmol/mL)/Δ LDH 48	0.363	0.045
MDA (μM)/Δ HG Finish line	−0.379	0.032

In addition, basal GR activity negatively correlated with the delta values of LDH at the finish line, 24 h and 48 h post-race. Moreover, basal GR activity negatively correlated with the fold increase of CK at the finish line. It was also demonstrated a significant positive correlation between basal CG content (oxidative damage to proteins) and the rise in LDH observed 24 h and 48 h post-race (Table 3). The inflammatory response observed after

the race did not correlate significantly with any of the plasma markers of oxidative stress parameters measured.

### 3.5. Multiple Regression Analysis

Results of the multiple regression analysis are listed in Table 4. When performing the multiple linear regression analysis using Age and GR as the predictive variables, a significant regression equation was obtained for the SJ delta Value dependent variable. This analysis would indicate that younger age as main predictor and higher basal GR concentration, a lower SJ delta value after finishing the ultramarathon was obtained. This regression model predicts the 28.3% of the variance. Another multiple linear regression model was obtained in which the dependent variable was the  $\Delta$  CK finish line value and the main predictive variables were Age and GR. In this scenario, the regression analysis model predicts a 18.3% of the variance.

**Table 4.** Linear regression models.

Model	R <sup>2</sup> Adjusted	Standardized Coefficients Beta	Standard Error	F (p)
Dependent Variable: $\Delta$ SJ finish line Covariables: Age, GR.	0.283	0.217	0.16389	0.6521 (0.005)
Dependent Variable: $\Delta$ CK finish line Covariables: Age, GR.	0.183	−0.413	0.15558	3.431 (0.002)

Abbreviations:  $\Delta$  SJ (Fold increase Squat Jump);  $\Delta$  CK (Fold increase Creatine Kinase); GR (Glutathione reductase).

As we have previously mentioned, according to the criterion proposed by Cohen [38], our regression models might be considered for their predictive value, explaining within a multicausal model context the influence of oxidative stress on muscle damage and fatigue after a severe effort such as running an ultramarathon.

## 4. Discussion

The present investigation aimed to ascertain the relationship between several athlete's plasma markers of oxidative stress and the degree of muscle strength and damage after ultraendurance exercise. Results of this study were also extended to investigate the possible runner's sex and age influence. It is important to remark that this short of studies present limitations regarding the sample size due to the difficulty to finish the competition by the runners. The demographic/anthropometric characteristics of the present study (age, body composition and resistance training) as well as muscle damage, acute inflammation and muscle strength variables have been previously analyzed and discussed by our group [3] (See Supplementary Table S1).

Briefly, male participants showed significant higher pre-race values for weight, BMR, BMI and percentage of muscular mass when compared to women runners [31,32]. The muscular membrane disruption variables, LDH and CK release, peaked after the race and returned to normal values after 24 h. In the Supplementary material section, we also have included results about acute inflammatory processes (CRP), muscle damage (CK and LDH) and muscle strength (SJ and HG), previously published by our research group [4]. No changes were observed in the performance of SJ and HG before the race when compared with the finish line. Both acute inflammation and muscle damage were observed in the finish line, as well as 24 h and 48 h post race.

Regarding the plasma markers of oxidative stress, a time-course analysis of GPx and GR activity, and the oxidative damage to lipids and proteins (MDA and CG, respectively) was performed at the finish line, 24 h and 48 h post-race. It has been showed that ultra endurance exercise is associated with a notably enhanced rate of oxygen utilization and the generation and accumulation of ROS [6]. Moreover, the glutathione system increases its activity to restore the cell redox balance when the formation of ROS is enhanced. Our data showed an increase of the oxidative damage to macromolecules (lipids and proteins)

indicating an increase of ROS cellular levels. Thus, lipid peroxidation damage appears to be increased in the finish line and 48 h post-race as confirmed by the MDA levels, proving the presence of oxidative damage to lipids two days after the extreme exercise. A partially recovering effect was observed 24 h after the race as can be seen in Table 2. At this respect, previous studies have shown controversial results regarding the blood MDA levels after ultraendurance exercise. Several studies showed an increase on the cellular MDA levels [14,16,39] compared to data supporting no lipid peroxidation effect after extreme endurance exercise [12,13]. In addition, Skenderi et al., [9] demonstrated an MDA levels decrease 48 h post-race when compared to control and post-race values. However, in this study, the sport type (running, swimming), the distance, the accumulated altitude or the anthropometric characteristics of the sample might be influencing these results. It is also noteworthy to mention that these differences can be attributed to methodological aspects. Authors used the TBARS (thiobarbituric acid-reacting substances) technique which, appear to be a less robust measure of lipid peroxidation [6].

The analysis of the CG content remained significantly elevated for all the time points of the study (finish line, 24 h post-race and 48 h post-race). Interestingly, Spanidis et al., [12] did not find significant differences for this parameter after an ultramarathon mountain race. This discrepancy is explained due to a sample size effect. In contrast, Turner et al., [16] demonstrated an increase in plasma CG content after an ultramarathon race, thus confirming oxidative damage to proteins after ultraendurance exercise.

Regarding the glutathione system enzymes, no significant differences were observed for the GPx activity. Conversely, the GR activity showed a significant increase in the finish line that was even greater 24 h post race, interestingly concurring with the partial MDA concentration recovery. Although both enzymes are mainly located in the intracellular compartment, their plasmatic activity have been broadly used as a measurement of the antioxidant status [40–43]. In the case of ultraendurance exercise, previous studies show contradictory results to what concern to the antioxidant enzymes [7,12,14,39], but our results support the hypothesis of a compensatory mechanism based on a temporary increase of the antioxidant defense to compensate an oxidative insult [44,45]. Although the activity of these two enzymes has been used to evaluate the presence of oxidative stress, GR is considered the limiting factor of these antioxidative system [46]. It is plausible that the increase of GR activity is not accompanied by an enhanced GPx activity because of other antioxidant enzymes such as catalase or paraoxonase also able to degrade hydrogen peroxide that could be affected by the intense exercise [10,47].

Moreover, it is remarkable that we report a significant negative correlation between the basal GR activity of the runners and the degree of muscle membrane disruption after the race. Thus, the basal activity of this enzyme correlated with [LDH] in the finish line, after 24 h and 48 h and with the [CK] in the finish line and after 24 h. In addition, the resting levels of oxidative damage to proteins (CG content) also showed a significant positive correlation with the magnitude of post-race muscle injury ([LDH] after 24 h and 48 h). It is important to notice that we assume that serum CK and LDH assess for muscle membrane disruption and do not necessarily correlate with muscle structural damage. Furthermore, we have also reported a significant positive correlation between basal GR activity and the improvement in the SJ performance as well as, a significant negative correlation between the basal levels of lipid peroxidation (MDA concentration) and the enhancement in the HG execution. Although there is a limitation on the correlation's coefficient power to assume an evident causality between oxidative stress and muscle fatigue, these novel findings, suggest that a stronger basal plasma oxidative status might improve muscle strength during ultraendurance sports practice. However, further studies are necessary to increase the number of research volunteers and validate the present results.

Finally, we have reported sex differences in oxidative damage to macromolecules. Surprisingly, female athletes showed higher CG content and less MDA levels than male athletes, although female athletes have less muscular mass and higher body fat mass percentage. There is almost no literature considering sex differences in type of events, probably

due to the difficulty in getting sufficient sample sizes. Although several studies include female runners in their research, they do not describe sex differences in the parameters measured [48,49]. Recently Devrim-Lanpir et al., reported significant interaction between time at exhaustion and dietary antioxidant intake in males, but not in females, who underwent an acute exhaustive exercise test (a cycle ergometer) followed by a treadmill test in a laboratory [50]. Moreover, the results of the multivariate analysis show us the predictive value of basal GR concentration and sex in relation to muscle fatigue and cell damage, after ultramarathon.

## 5. Conclusions

Interestingly, the study yielded new results regarding the age of the runners. Senior runners (45–53) showed significant higher levels of lipid peroxidation (MDA concentration) than medium (38–44) and young runners (31–37) throughout the study. A plausible explanation would be the higher body fat percentage observed in senior runners, together with the loss of muscular mass compared to younger runners (Table 1). These results are in agreement with Hattori and cols. who reported that ultramarathon runners aging less than 45 years old had lower ROS levels at all race points [51]. Again, larger series would be necessary to study the predictive value of this assay to consider if a personalized antioxidant supplementation might promote the physiological recovery after great physical efforts.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/3/355/s1>, Supplementary Table S1. Evolution of muscle strength (SJ and HG), muscle damage (LDH and CK) and acute inflammation (CRP) biomarkers.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.G., C.H., E.C.-B. and M.M.; methodology, P.B., B.H. and C.H.; formal analysis, C.G., M.M. and C.H.; investigation, Barbara Hernando, I.M.-N. and C.H.; writing—original draft preparation, E.C.-B., C.G., C.H.; writing—M.M., P.B., C.H.; funding acquisition, C.H. and I.M.-N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Vithas Hospitals group (<https://vithas.es>), Penyagolosa Trails organization (<http://penyagolosatrails.com>), catedra Endavant Villarreal CF de l'Esport (<https://endavant.villarrealcf.es/>) and the following grant code: UJI-B2019-38. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Institutional Review Board Statement:** The investigation was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approval for the project was obtained from the research Ethics Committee of the University Jaume I of Castellon (Expedient Number CD/007/2019). This study is enrolled in the ClinicalTrials.gov database, with the code number NCT03990259 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all volunteers involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article or supplementary material.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Panizo González, N.; Reque Santivañez, J.E.; Hernando Fuster, B.; Collado Boira, E.J.; Martínez-Navarro, I.; Chiva Bartoll, Ó.; Hernando Domingo, C. Quick Recovery of Renal Alterations and Inflammatory Activation after a Marathon. *Kidney Dis.* **2019**, *5*, 259–265. [[CrossRef](#)]
2. Martínez-Navarro, I.; Sánchez-Gómez, J.; Sanmiguel, D.; Collado, E.; Hernando, B.; Panizo, N.; Hernando, C. Immediate and 24-h post-marathon cardiac troponin T is associated with relative exercise intensity. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
3. Martínez-Navarro, I.; Sánchez-Gómez, J.M.; Collado-Boira, E.J.; Hernando, B.; Panizo, N.; Hernando, C. Cardiac damage biomarkers and heart rate variability following a 118-km mountain race: Relationship with performance and recovery. *J. Sport. Sci. Med.* **2019**, *18*, 615.
4. Martínez-Navarro, I.; Sánchez-Gómez, J.M.; Aparicio, I.; Priego-Quesada, J.I.; Pérez-Soriano, P.; Collado, E.; Hernando, B.; Hernando, C. Effect of mountain ultramarathon distance competition on biochemical variables, respiratory and lower-limb fatigue. *PLoS ONE* **2020**, *15*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sies, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **1997**, *82*, 291–295. [[CrossRef](#)]

6. Turner, J.E.; Bennett, S.J.; Bosch, J.A.; Griffiths, H.R.; Aldred, S. Ultra-endurance exercise: Unanswered questions in redox biology and immunology. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 989–995.
7. Kłapcińska, B.; Waalkiewicz, Z.; Chrapusta, S.J.; Sadowska-Krepa, E.; Czuba, M.; Langfort, J. Metabolic responses to a 48-h ultra-marathon run in middle-aged male amateur runners. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2013**, *113*, 2781–2793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Marumoto, M.; Suzuki, S.; Akihiro, H.; Kazuyuki, H.; Kiyoshi Shibata, A.; Fuku, M.; Goto, C.; Tokudome, Y.; Hoshino, H.; Imaeda, N.; et al. Changes in thioredoxin concentrations: An observation in an ultra-marathon race. *Environ. Health Prev. Med.* **2010**, *15*, 129–134. [[CrossRef](#)]
9. Skenderi, K.P.; Tsironi, M.; Lazaropoulou, C.; Anastasiou, C.A.; Matalas, A.-L.; Kanavaki, I.; Thalmann, M.; Goussetis, E.; Papassotiropoulos, I.; Chrousos, G.P. Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. *Eur. J. Clin. Invest.* **2008**, *38*, 159–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Benedetti, S.; Catalani, S.; Peda, F.; Luchetti, F.; Citarella, R.; Battistelli, S. Impact of the 24-h ultramarathon race on homocysteine, oxidized low-density lipoprotein, and paraoxonase 1 levels in professional runners. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [[CrossRef](#)]
11. Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Moretti, S.; Pratali, L.; Giardini, G.; Tacchini, P.; Dellanoce, C.; Tonacci, A.; Mastorci, F.; Borghini, A.; et al. Effects of mountain ultra-marathon running on ROS production and oxidative damage by micro-invasive analytic techniques. *PLoS ONE* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Spanidis, Y.; Stagos, D.; Orfanou, M.; Goutzourelas, N.; Bar-Or, D.; Spandidos, D.; Kouretas, D. Variations in Oxidative Stress Levels in 3 Days Follow-up in Ultramarathon Mountain Race Athletes. *J. Strength Cond. Res.* **2017**, *31*, 582–594. [[CrossRef](#)]
13. Kabasakalis, A.; Kyparos, A.; Tsalis, G.; Loupos, D.; Pavlidou, A.; Kouretas, D. Blood Oxidative Stress Markers After Ultramarathon Swimming. *J. Strength Cond. Res.* **2011**, *25*, 805–811. [[CrossRef](#)]
14. Neubauer, O.; König, D.; Kern, N.; Nics, L.; Wagner, K.H. No indications of persistent oxidative stress in response to an ironman triathlon. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2008**, *40*, 2119–2128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Miyata, T.; Wada, Y.; Cai, Z.; Iida, Y.; Horie, K.; Yasuda, Y.; Maeda, K.; Kurokawa, K.; Van Ypersele De Strihou, C. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int.* **1997**, *51*, 1170–1181. [[CrossRef](#)]
16. Turner, J.E.; Hodges, N.J.; Bosch, J.A.; Aldred, S. Prolonged depletion of antioxidant capacity after ultraendurance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2011**, *43*, 1770–1776. [[CrossRef](#)]
17. Cheng, A.J.; Yamada, T.; Rassier, D.E.; Andersson, D.C.; Westerblad, H.; Lanner, J.T. Reactive oxygen/nitrogen species and contractile function in skeletal muscle during fatigue and recovery. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 5149–5160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mason, S.A.; Morrison, D.; McConell, G.K.; Wadley, G.D. Muscle redox signalling pathways in exercise. Role of antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *98*, 29–45. [[CrossRef](#)]
19. Bernat-Adell, M.D.; Collado-Boira, E.J.; Moles-Julio, P.; Panizo-GonzálezGonz, N.; Martínez-Navarro, I.; Hernando-Fuster, B.; Hernando-Domingo, C. Recovery of Inflammation, Cardiac, and Muscle Damage Biomarkers After Running a Marathon. *J. Strength Cond. Res.* **2019**. [[CrossRef](#)]
20. Lawrence, R.A.; Parkhill, L.K.; Burk, R.F. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: Its nature and the effect of selenium deficiency. *J. Nutr.* **1978**, *108*, 981–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Smith, I.K.; Vierheller, T.L.; Thorne, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 408–413. [[CrossRef](#)]
22. Richard, M.J.; Guiraud, P.; Meo, J.; Favier, A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1992**, *577*, 9–18. [[CrossRef](#)]
23. Romero, F.J.; Bosch-Morell, F.; Romero, M.J.; Jareño, E.J.; Romero, B.; Marín, N.; Romá, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health Perspect.* **1998**, *106*, 1229–1234. [[CrossRef](#)]
24. Levin, R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 464–478.
25. Tiana, L.; Caib, Q.; Wei, H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 1477–1484. [[CrossRef](#)]
26. Dill, D.B.; Costill, D.L. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J. Appl. Physiol.* **1974**, *37*, 247–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Samozino, P.; Morin, J.B.; Hintzy, F.; Belli, A. A simple method for measuring force, velocity and power output during squat jump. *J. Biomech.* **2008**, *41*, 2940–2945. [[CrossRef](#)]
28. Bohannon, R.W. Muscle strength. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2015**, *18*, 465–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Dourado, V.Z.; de Antunes, L.C.O.; Tanni, S.E.; de Paiva, S.A.R.; Padovani, C.R.; Godoy, I. Relationship of Upper-Limb and Thoracic Muscle Strength to 6-min Walk Distance in COPD Patients. *Chest* **2006**, *129*, 551–557. [[CrossRef](#)]
30. Reuter, S.E.; Massy-Westropp, N.; Evans, A.M. Reliability and validity of indices of hand-grip strength and endurance. *Aust. Occup. Ther. J.* **2011**, *58*, 82–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ozkaplan, A.; Rhodes, E.C.; Sheel, A.W.; Taunton, J.E. A comparison of inspiratory muscle fatigue following maximal exercise in moderately trained males and females. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2005**, *95*, 52–56. [[CrossRef](#)]
32. Tong, T.K.; Wu, S.; Nie, J.; Baker, J.S.; Lin, H. The occurrence of core muscle fatigue during high-intensity running exercise and its limitation to performance: The role of respiratory work. *J. Sport. Sci. Med.* **2014**, *13*, 244–251.

33. Byrne, N.M.; Hills, A.P.; Hunter, G.R.; Weinsier, R.L.; Schutz, Y. Metabolic equivalent: One size does not fit all. *J. Appl. Physiol.* **2005**, *99*, 1112–1119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mohd Razali, N.; Bee Wah, Y. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *J. Stat. Model. Anal.* **2011**, *2*, 21–33.
35. Thomas, J.; Nelson, J.; Silverman, S. *Research Methods in Physical Activity*; Human Kinetics: Champaign, IL, USA, 2015.
36. Stoica, P.; Söderström, T. On the parsimony principle. *Int. J. Control* **1982**, *36*, 409–418. [[CrossRef](#)]
37. Williams, M.N.; Grajales, C.A.G.; Kurkiewicz, D. Assumptions of multiple regression: Correcting two misconceptions. *Pract. Assess. Res. Eval.* **2013**, *18*, 1–14. [[CrossRef](#)]
38. Cohen, J. The Analysis of Variance and Covariance. In *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd ed.; Taylor Francis Group: Abingdon, UK, 1988.
39. Knez, W.L.; Jenkins, D.G.; Coombes, J.S. Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2007**, *39*, 283–288. [[CrossRef](#)]
40. Irigaray, P.; Caccamo, D.; Belpomme, D. Oxidative stress in electrohypersensitivity self-reporting patients: Results of a prospective in vivo investigation with comprehensive molecular analysis. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *42*, 1885–1898. [[CrossRef](#)]
41. Beltrán-Sarmiento, E.; Arregoitia-Sarabia, C.K.; Floriano-Sánchez, E.; Sandoval-Pacheco, R.; Galván-Hernández, D.E.; Coballase-Urrutia, E.; Carmona-Aparicio, L.; Ramos-Reyna, E.; Rodríguez-Silverio, J.; Cárdenas-Rodríguez, N. Effects of valproate monotherapy on the oxidant-antioxidant status in mexican epileptic children: A longitudinal study. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*. [[CrossRef](#)]
42. Arribas, L.; Almansa, I.; Miranda, M.; Muriach, M.; Romero, F.J.; Villar, V.M. Serum Malondialdehyde Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in a Longitudinal Study of Gestational Diabetes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155353. [[CrossRef](#)]
43. Brigelius-Flohé, R.; Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 3289–3303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sánchez-Vallejo, V.; Benlloch-Navarro, S.; Trachsels-Moncho, L.; López-Pedrajas, R.; Almansa, I.; Romero, F.J.; Miranda, M. Alterations in glutamate cysteine ligase content in the retina of two retinitis pigmentosa animal models. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *96*, 245–254. [[CrossRef](#)]
45. Tsuru-Aoyagi, K.; Potts, M.B.; Trivedi, A.; Pfankuch, T.; Raber, J.; Wendland, M.; Claus, C.P.; Koh, S.-E.; Ferriero, D.; Noble-Haeusslein, L.J. Glutathione peroxidase activity modulates recovery in the injured immature brain. *Ann. Neurol.* **2009**, *65*, 540–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Finkler, M.; Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. The relationship between oxidative stress and exercise. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **2014**, *25*, 1–11. [[CrossRef](#)]
47. Somani, S.M.; Frank, S.; Rybak, L.P. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1995**, *51*, 627–634. [[CrossRef](#)]
48. Ginsburg, G.S. Effects of a Single Bout of Ultraendurance Exercise on Lipid Levels and Susceptibility of Lipids to Peroxidation in Triathletes. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1996**, *276*, 221. [[CrossRef](#)]
49. Nieman, D.C.; Dumke, C.I.; Henson, D.A.; Mcanulty, S.R.; Mcanulty, L.S.; Lind, R.H.; Morrow, J.D. Immune and Oxidative Changes During and Following the Western States Endurance Run. *Int. J. Sport. Med.* **2003**, *24*, 541–547. [[CrossRef](#)]
50. Devrim-Lanpir, A.; Bilgic, P.; Kocahan, T.; Deliceoğlu, G.; Rosemann, T.; Knechtel, B. Total Dietary Antioxidant Intake Including Polyphenol Content: Is It Capable to Fight against Increased Oxidants within the Body of Ultra-Endurance Athletes? *Nutrients* **2020**, *12*, 1877. [[CrossRef](#)]
51. Hattori, N.; Hayashi, T.; Nakachi, K.; Ichikawa, H.; Gotoau, C.; Tokudome, Y.; Kuriki, K.; Hoshino, H.; Shibata, K.; Yamada, N.; et al. Changes of ROS during a two-day ultra-marathon race. *Int. J. Sports Med.* **2009**, *30*, 426–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]