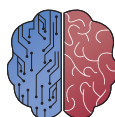




UNIVERSIDAD DE BURGOS  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR  
Grado en Ingeniería de la Salud



INGENIERÍA  
DE LA SALUD

**TFG del Grado en Ingeniería de la  
Salud**

**Influencia de la  
suplementación con  
probióticos en el estado  
oxidativo de deportistas de  
Crossfit**

Presentado por Ignacio González Arnaiz  
en Universidad de Burgos

16 de enero de 2025

Tutor: Natalia Busto Vázquez







UNIVERSIDAD DE BURGOS  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR  
Grado en Ingeniería de la Salud



D. Natalia Busto Vázquez, profesor del departamento de Ciencias de la Salud, área de área de Fisiología.

Expone:

Que el alumno D. Ignacio González Arnaiz, con DNI 70066686S, ha realizado el Trabajo final de Grado en Ingeniería de la Salud titulado Influencia de la suplementación con probióticos en el estado oxidativo de deportistas de Crossfit.

Y que dicho trabajo ha sido realizado por el alumno bajo la dirección del que suscribe, en virtud de lo cual se autoriza su presentación y defensa.

En Burgos, 16 de enero de 2025

Vº. Bº. del Tutor:

Dña. Natalia Busto Vázquez





## Resumen

Se conoce como estrés oxidativo un estado de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes que puede provocar daño molecular en el organismo humano. Los atletas de Crossfit están especialmente expuestos a este problema debido a sus entrenamientos de alta intensidad. En relación con estos dos conceptos, los probióticos han mostrado potencial para regular el estrés oxidativo a través de la regulación de la microbiota intestinal, aunque su eficacia en deportistas de Crossfit no ha sido suficientemente estudiada.

Este Trabajo de Fin de Grado afronta una investigación detallada acerca de la suplementación con (*Lactobacillus plantarum* PS128) y su impacto en el estrés oxidativo en atletas de Crossfit. Se ha seguido un ensayo doble ciego en 24 deportistas de Crossfit (14 en el grupo probiótico y 10 en el grupo placebo) durante 4 semanas. Los participantes han recibido diariamente una cápsula de probiótico (1 x 10<sup>10</sup> UFC de *Lactobacillus plantarum* PS128) o de placebo (cápsula de 2g de dextrosa).

Para el correcto desarrollo de la investigación, se han llevado a cabo distintas técnicas espectrofotométricas y espectrofluorimétricas para la obtención de proteínas totales en plasma así como otros biomarcadores específicos de estrés oxidativo en plasma (proteínas carboniladas, malondialdehído-TBARs, capacidad antioxidante total por FRAP y niveles de glutatión oxidado y reducido).

A pesar de los antecedentes bibliográficos, no se han apreciado diferencias estadísticamente significativas en los biomarcadores medidos. Esto sugiere que, en este estudio, la cepa probiótica utilizada no ha tenido un efecto significativo en el estrés oxidativo de los atletas de Crossfit bajo las condiciones estudiadas.

## Descriptores

Probióticos, estrés oxidativo, Crossfit, suplementación, análisis estadístico, atletas, investigación, ejercicio físico, salud, antioxidantes, oxidantes, biomarcadores.

## Abstract

Oxidative stress is known as a state of imbalance between oxidizing and antioxidant agents that can cause molecular damage in the human body. Crossfit athletes are particularly exposed to this problem due to their high-intensity training. In relation to these two concepts, probiotics have shown potential to regulate oxidative stress through the regulation of gut microbiota, although their effectiveness in Crossfit athletes has not been sufficiently studied.

This Final Degree Project undertakes a detailed investigation about supplementation with (*Lactobacillus plantarum PS128*) and its impact on oxidative stress in Crossfit athletes. A double-blind trial was conducted on 24 Crossfit athletes (14 in the probiotic group and 10 in the placebo group) for 4 weeks. Participants received daily either a probiotic capsule ( $1 \times 10^{10}$  CFU of *Lactobacillus plantarum PS128*) or a placebo capsule (2g of dextrose). For the proper development of the research, different spectrophotometric and spectrofluorimetric techniques were carried out to obtain total plasma proteins as well as other specific oxidative stress biomarkers in plasma (carbonylated proteins, malondialdehyde-TBARs, total antioxidant capacity by FRAP, and oxidized and reduced glutathione levels).

Despite the bibliographic background, no statistically significant differences were observed in the measured biomarkers. This suggests that, in this study, the probiotic strain used did not have a significant effect on oxidative stress in Crossfit athletes under the studied conditions.

## Keywords

Probiotics, oxidative stress, Crossfit, supplementation, statistical analysis, athletes, research, physical exercise, health, antioxidants, oxidants, biomarkers.



---

# Índice general

---

Índice general	iii
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vii
Introducción	1
Objetivos	5
Conceptos teóricos	7
3.1. Estrés oxidativo . . . . .	7
3.2. Radicales libres biológicos . . . . .	8
3.3. Mecanismos de defensa antioxidantes . . . . .	15
3.4. Biomarcadores de estrés oxidativo . . . . .	17
3.5. Estrés oxidativo y salud humana . . . . .	19
3.6. Estrés oxidativo y deporte . . . . .	20
3.7. Crossfit . . . . .	20
3.8. Estado del arte y trabajos relacionados . . . . .	21
Metodología	27
4.1. Descripción de los datos . . . . .	27
4.2. Técnicas y herramientas . . . . .	30
Resultados	39
5.1. Resumen de resultados . . . . .	39
5.2. Discusión . . . . .	39
5.3. Análisis de la normalidad de los datos . . . . .	40

5.4. Análisis de la homocedasticidad de varianzas . . . . .	41
5.5. Análisis estadístico mediante ANOVA factorial de medidas repetidas . . . . .	42
5.6. Análisis estadístico mediante la aplicación web . . . . .	47
<b>Conclusiones</b>	<b>65</b>
6.1. Aspectos relevantes . . . . .	67
<b>Líneas de trabajo futuras</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>73</b>

---

## Índice de figuras

---

3.1.	Representación esquemática del estrés oxidativo [Ivot, nd]	7
3.2.	Representación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) [Molina-Heredia, 2012]	10
3.3.	Representación de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) [PeterHermesFurian, 2020]	11
3.4.	Estructura de la NADPH oxidasa [Álvarez Cardona et al., 2009]	13
3.5.	Reacción del anión peroxinitrito [Bueno, 2015]	14
3.6.	Reacción de Fenton y de Haber-Weiss [Macedo-Márquez, 2012]	14
3.7.	Esquema del deporte y el estrés oxidativo [Sureda, 2018]	21
4.1.	Estructura de resonancia de la molécula del azul de Coomassie G-250 [Bradford, 1976]	30
4.2.	Estructura de la 2,4-dinitrofenilhidracina [Byjus, 2020]	31
4.3.	Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico [Weitner et al., 2016]	32
4.4.	Reducción del ion férrico a ion ferroso [Sadeer et al., 2020]	33
4.5.	Reacción entre el glutatión reducido y el o-ftalaldehído [Tsikas et al., 1999]	33
5.1.	Selección de archico Excel. Fuente propia con aplicación.	40
5.2.	Ejemplo de estadística descriptiva de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.	47
5.3.	Ejemplo de ANOVA de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.	48
5.4.	Ejemplo de pruebas T pareadas de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.	49

5.5.	Desplegable con los distintos gráficos. Fuente propia con aplicación. . . . .	50
5.6.	Ejemplo de un gráfico de cajas de Carbonilos. Fuente propia con aplicación. . . . .	50
5.7.	Ejemplo de un gráfico de violín de Carbonilos. Fuente propia con aplicación. . . . .	51
5.8.	Ejemplo de un gráfico de puntos de Carbonilos. Fuente propia con aplicación. . . . .	51
5.9.	Ejemplo de un gráfico combinado de Carbonilos. Fuente propia con aplicación. . . . .	52
5.10.	Ejemplo de un gráfico de interacción de Carbonilos. Fuente propia con aplicación. . . . .	52

---

## Índice de tablas

---

5.1. Pruebas de Normalidad Shapiro-Wilk. Fuente propia. . . . .	41
5.2. Test de Levene para la homocedasticidad de varianzas. Fuente propia . . . . .	42
5.3. Análisis de Varianza (ANOVA) Factorial de Medidas Repetidas	43
5.4. Resumen de resultados estadísticos del ensayo Bradford. Fuente propia . . . . .	53
5.5. Resumen de resultados estadísticos resumidos del ensayo Nanodrop. Fuente propia . . . . .	55
5.6. Resumen de resultados estadísticos del ensayo Carbonilos. Fuente propia . . . . .	56
5.7. Resumen de resultados estadísticos del ensayo MDA. Fuente propia	58
5.8. Resumen de resultados estadísticos del ensayo FRAP. Fuente propia . . . . .	59
5.9. Resumen de resultados estadísticos del ensayo GSH. Fuente propia	61
5.10. Resumen de resultados estadísticos del ensayo GSSG. Fuente propia . . . . .	62



---

# Introducción

---

Este estudio se enmarca en el proyecto “Efecto de los probióticos en el rendimiento deportivo y el daño intestinal en los integrantes del club de Crossfit Bikain” que ha recibido la aprobación del Comité de Ética para las investigaciones con seres humanos, sus muestras y sus datos (CEISH) de Universidad del País Vasco (M10\_2022\_199).

Se trata de un estudio doble ciego [IMIM, 2003] en el que los participantes son deportistas de Crossfit que se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos. Uno de ellos recibió un suplemento de probióticos (*Lactobacillus plantarum* PS128  $1 \times 10^{10}$  UFC por cápsula de la marca Swandson) mientras que el otro tomó placebo (cápsula de 2g de dextrosa) durante cuatro semanas. El grupo que recibió placebo constaba de 10 participantes mientras que el grupo suplementado con probióticos constaba de 14 sujetos. Cabe destacar que la dieta de todos ellos era una dieta mediterránea pautada por el nutricionista del centro y con especial limitación de alimentos fermentados, derivados lácteos que contuvieran probióticos (kefir, yogur, etc.) y suplementos alimenticios.

El total de participantes del ensayo fue de 33 individuos, debido a que 9 sujetos no lograron completar el estudio adecuadamente. A los deportistas se les realizó una serie de pruebas de rendimiento antes de comenzar el periodo de suplementación y también al finalizar el mismo.

En un principio, estaba planteado que la Universidad de Burgos recibiera de manera anonimizada cuatro muestras de sangre de cada individuo extraídas directamente en el club deportivo. Estas muestras corresponderían a pre y post- tratamiento (suplementación) tanto en estado basal como tras la realización de ejercicio intenso. El hecho de incluir extracciones a nivel basal y post-ejercicio, nos permitirían dilucidar si el estado oxidativo de partida, tenía algún efecto en la potencial efectividad de la suplementación.

No obstante, no todos los clubs implicados nos mandaron las 4 muestras, por lo que finalmente, a la hora de desarrollar la parte experimental se utilizaron todas las muestras, pero al evaluar los resultados y saber que, apenas se disponían de datos a nivel basal, se decidió analizar únicamente el efecto de la suplementación tras la realización de ejercicio intenso.

La Universidad del País Vasco realizó todas las evaluaciones físicas, que comprendieron tanto pruebas aeróbicas como anaeróbicas. Llevó también a cabo la toma de medidas antropométricas, la recopilación de datos a través de cuestionarios sobre el registro alimentario, así como, las escalas del grado de recuperación percibido y de Borg para medir el grado de esfuerzo. Todos estos datos, junto con la información del sujeto sobre su sexo y edad, se incorporaron a una base de datos anonimizada. La Universidad de Burgos aportó los resultados experimentales de biomarcadores de estado oxidativo y de inflamación intestinal (estudiados en el TFG de otra compañera) en plasma obtenidos a partir de las muestras sanguíneas proporcionadas por el club.

Esta memoria incluye varios apartados que vamos a explicar brevemente a continuación. En primer lugar, encontramos una descripción de los objetivos del estudio. Seguidamente encontramos la descripción de los conceptos teóricos necesarios para llevar a cabo este estudio. En tercer lugar, podemos encontrar una descripción de la metodología utilizada en el estudio, es decir, se explican detalladamente los métodos utilizados en cada experimento. A continuación, encontramos un análisis de los resultados obtenidos. Por último, nos encontramos con las conclusiones generales de la investigación junto con las posibles líneas de trabajo futuras que permitan continuar la investigación, así como toda la bibliografía tenida en cuenta para la elaboración de la memoria. Todos estos apartados nos permiten profundizar en la investigación llevada a cabo para poder entenderla y concluirla correctamente. Por otra parte, en el anexo se encuentran los detalles relativos a la parte experimental, junto con los resultados obtenidos y los análisis estadísticos, ya que es la parte más extensa de esta investigación.

Por último, este Trabajo de Fin de Grado refleja claramente la relación entre el campo de la salud y el de la ingeniería. Esto se debe a que la investigación sobre el efecto de los probióticos en el estrés oxidativo de deportistas de Crossfit se fundamenta en los conocimientos adquiridos en asignaturas como Bioquímica y Fisiología. Además, el análisis estadístico se fundamenta en la asignatura bioestadística, que puede considerarse como una asignatura de carácter mixto entre la biología y la informática. El componente ingenieril de este trabajo se observa en el desarrollo de la



aplicación web con Shiny para el análisis estadístico de los datos ya que se basa en conceptos de asignaturas como Programación.



---

# Objetivos

---

## Objetivo principal

El objetivo central de este Trabajo de Fin de Grado es el estudio de la suplementación con  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Lactobacillus plantarum* PS128 durante cuatro semanas sobre el estado oxidativo en deportistas de Crossfit. Para ello, se han llevado a cabo distintos experimentos que detallaremos más adelante con el fin de probar si esta suplementación pudiese tener efectos positivos en deportistas de alto nivel, ayudando al organismo a mantener un equilibrio microbiano saludable en el intestino, lo que conlleva un menor estrés oxidativo.

## Objetivos secundarios

En torno al objetivo principal, es posible desglosar una serie de objetivos secundarios que han ayudado alcanzar la meta de nuestra investigación y que son los siguientes:

## Objetivos técnicos

1. Establecer sólidos protocolos de trabajo para la determinación de distintos biomarcadores de estrés oxidativo.
2. Implementar técnicas espectrofotométricas y espectrofluorimétricas para la cuantificación precisa de biomarcadores de estrés oxidativo en muestras plasmáticas.
3. Cuantificar mediante la realización de rectas de calibrados los diferentes parámetros del estado oxidativo a través de softwares específicos (Gen5 2.09).

4. Llevar a cabo una evaluación del daño oxidativo y la capacidad antioxidante en plasma antes y después del ejercicio con y sin la suplementación (proteínas totales, carbonilos totales, actividad antioxidante por FRAP, peroxidación lipídica por MDA y niveles de glutatión reducido y oxidado).
5. Evaluar el efecto del ejercicio intenso sobre el estado oxidativo y la capacidad antioxidante.
6. Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el laboratorio utilizando softwares específicos (Statgraphics).
7. Desarrollar una herramienta informática reutilizable y amoldable a futuros proyectos relacionados con el análisis estadístico de datos biomédicos.
8. Facilitar la interpretación de los resultados experimentales tanto para expertos como para no expertos, a través de una herramienta informática cuya interfaz de usuario sea intuitiva.

### **Objetivos personales**

1. Adquirir conocimientos y habilidades tanto en técnicas básicas de laboratorio como en aquellas orientadas a la determinación de distintos biomarcadores de estrés oxidativo en el plasma sanguíneo.
2. Desarrollar competencias en el manejo y procesamiento de muestras biológicas siguiendo protocolos establecidos.
3. Profundizar en los conocimientos sobre la fisiología del ejercicio, más específicamente en lo referente al estrés oxidativo y el daño muscular.
4. Interpretar los resultados obtenidos para determinar si la intervención disminuye el estrés oxidativo generado por el ejercicio intenso.
5. Adquirir conocimientos en el uso de Shiny y Python para el desarrollo de una aplicación interactiva enfocada en el análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante los ensayos científicos.

---

## Conceptos teóricos

---

En este apartado voy a llevar a cabo una explicación detallada acerca de los conceptos básicos necesarios para una correcta comprensión de la investigación que se ha realizado en este Trabajo de Fin de Grado sobre el efecto de la suplementación con probióticos en deportistas de CrossFit.

### 3.1. Estrés oxidativo

#### Definición

Tradicionalmente, se conoce como estrés oxidativo una situación de desequilibrio global entre la acción de los agentes oxidantes, principalmente derivados del oxígeno, y los agentes antioxidantes de un organismo, en favor de los primeros (Figura 3.1). Esta definición fue establecida por el médico, bioquímico y profesor universitario alemán Helmut Sies en 1985 [Sies, 1985].



Figura 3.1: Representación esquemática del estrés oxidativo [Ivot, nd]

Según la definición establecida por P. Jones en 2006, el estrés oxidativo hace referencia al desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros. Este desequilibrio desemboca en una alteración de la señalización y el control redox, provocando un determinado daño molecular [Jones, 2006]. Esta redefinición se estableció debido a nuevas evidencias científicas en las que se realizaron los siguientes hallazgos [Pacheco, 2011]:

- En condiciones fisiológicas los agentes oxidantes actúan como moléculas de señalización.
- La activación específica de rutas sensibles al estado redox puede ocurrir de manera independiente al equilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes.
- Los altos niveles de agentes oxidantes no son selectivos en su acción oxidante, lo que significa que el daño oxidativo no se limita únicamente a las macromoléculas.

Los agentes oxidantes que causan este desequilibrio no siempre son de origen endógeno, sino que también pueden tener origen exógeno. Este es el caso de los pesticidas, los combustibles, las radiaciones ionizantes, etc. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno de origen endógeno son los agentes más nocivos ya que pueden reaccionar con prácticamente cualquier molécula del organismo, como los ácidos nucleicos, lo que puede causar mutaciones. Además, son también capaces de reaccionar con los ácidos grasos libres poliinsaturados, que darían lugar a reacciones en cadena de lipoperoxidación con las proteínas.

El estrés oxidativo puede tener efectos perjudiciales, en mayor o menor medida, a nivel sistémico, celular y molecular. Algunos de estos efectos perjudiciales son la inflamación crónica, la disfunción celular, el envejecimiento prematuro e incluso la aparición de enfermedades crónicas como el cáncer o la diabetes [Álvarez Calatayud, 2016].

## 3.2. Radicales libres biológicos

### Definición

Se conoce como radicales libres a aquellas moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en los orbitales externos de su estructura atómica. La presencia de estos electrones no apareados conlleva una inestabilidad y reactividad molecular elevada. Del mismo modo, estas moléculas

tienen también predisposición a comportarse como oxidantes o reductores, dependiendo de si donan o reciben un electrón de otras moléculas.

Cuando un radical libre reacciona con otra molécula más estable, recibe un electrón de esta, lo que tiene como resultado su estabilización. Sin embargo, este proceso tiene como consecuencia la formación de un radical libre en la otra molécula, que, del mismo modo, será capaz de reaccionar con otras moléculas, creando una cadena de sucesivas reacciones de propagación. Esta cadena de reacciones continúa hasta la fase de terminación que puede ocurrir de dos formas:

- Por la acción de un antioxidante, que aporta un electrón al radical libre, estabilizándolo.
- Cuando dos radicales libres reaccionan entre sí, apareando sus electrones desapareados.

Estos cambios estructurales y funcionales inducidos por los radicales libres y las reacciones en cadena pueden tener importantes repercusiones a nivel celular, tisular y orgánico. Por ejemplo, es sabido que el radical hidroxilo es capaz de reaccionar con los componentes de la molécula de ADN, causando de este modo, daños en la desoxirribosa al igual que en las bases púricas y pirimidínicas. Del mismo modo, la formación de radicales libres desencadenada por metales puede llegar a causar daños en los residuos de ácidos grasos poliinsaturados, que son muy receptivos a la oxidación [Pacheco, 2011].

## Tipos de radicales libres

Los radicales libres que provienen del oxígeno son la clase más predominante en los sistemas biológicos. Además, existen otros radicales libres biológicamente significativos, como los metales de transición o los radicales libres derivados del nitrógeno, conocidos como especies reactivas de nitrógeno (RNS) [Pacheco, 2011]. A continuación, se detallan los principales tipos de radicales libres:

- **Especies reactivas de oxígeno (ERO):** incluyen el oxígeno molecular ( $O_2$ ), el ozono ( $O_3$ ), el oxígeno en estado de singlete ( $O_2^1\Delta_g$ ) y otras especies de oxígeno parcialmente reducidas. Entre las especies de oxígeno parcialmente reducidas podemos encontrar el anión superóxido

( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el hidroperoxilo ( $HO_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ). Todas ellas son generadas gracias a la excitación o ruptura del oxígeno molecular y son notablemente más reactivas que el oxígeno en su estado basal (Figura 3.2). A pesar de que el peróxido de hidrógeno no sea un radical libre, actúa como precursor primario del radical hidroxilo en la producción de radicales. Estas especies reactivas de oxígeno son moléculas elevadamente reactivas, afectando al organismo mediante reacciones bioquímicas de óxido-reducción, que pueden ocurrir como parte normal del metabolismo celular o por influencias patológicas [Escorza and Salinas, 2009].

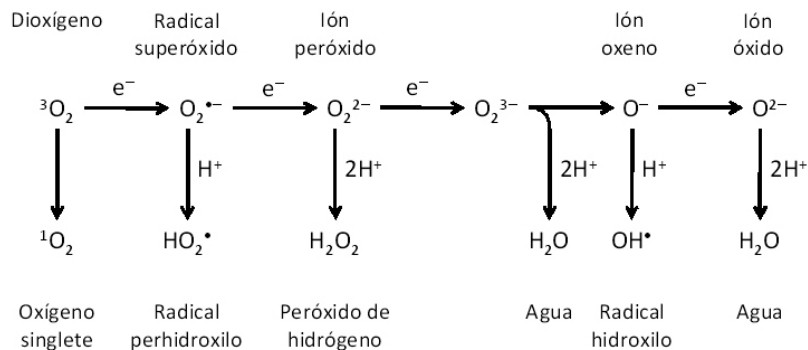


Figura 3.2: Representación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) [Molina-Heredia, 2012]

- **Metales de transición:** Se conoce como metales de transición a los elementos que se encuentran en el primer periodo de la serie 'd' de la tabla periódica, es decir, el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cobalto (Co), el níquel (Ni) y el cobre (Cu). Estos metales poseen la capacidad de alcanzar la estabilidad por sí mismos, sin la necesidad de reaccionar con otros elementos. Esta estabilidad se obtiene mediante la utilización de electrones de niveles o subniveles internos que completan su último nivel de energía, que tiene como consecuencia la llamada transición electrónica. La transición electrónica es un fenómeno donde la falta de electrones en el nivel del que se transfirieron es compensada por electrones de otros niveles o subniveles. Es la causa de que la mayoría de los metales de transición existan en forma de radical libre ya que suelen presentar electrones desapareados [Escorza and Salinas, 2009].
- **Otros radicales libres:** Además de las especies reactivas de oxígeno, existen otros tipos de radicales libres de importancia biológica, como son las especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las RNS incluyen



principalmente el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) (Figura 3.3). El óxido nítrico es un radical altamente reactivo que desempeña funciones biológicas como la regulación del sistema nervioso, los procesos de agregación plaquetaria y coagulación sanguínea y la neurotransmisión, pero que puede también causar daño oxidativo y muerte celular. Puede reaccionar con el oxígeno molecular para dar lugar al dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), que a su vez genera junto con el oxígeno, el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que es una especie elevadamente reactiva. Del mismo modo, existen otros radicales libres de diferente naturaleza como son el ión hipoclorito (ClO<sup>-</sup>) y el radical triclorometilo (CCl<sub>3</sub>). El radical triclorometilo se produce por la acción del citocromo P450 durante el metabolismo del tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) [Escorza and Salinas, 2009].

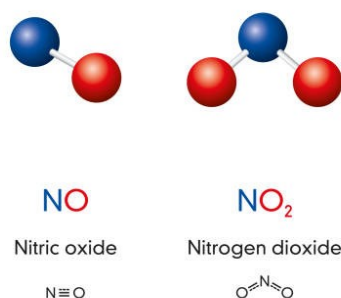


Figura 3.3: Representación de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) [PeterHermesFurian, 2020]

## Sistemas productores de radicales libres

En el organismo humano, los radicales libres se generan de diversas maneras: entre los principales métodos de producción se incluyen el metabolismo celular aeróbico y anaeróbico, las reacciones enzimáticas y no enzimáticas, así como la exposición a agentes oxidantes ambientales [Quevedo et al., 2003].

### Metabolismo aeróbico celular

Durante el metabolismo aeróbico, que ocurre en las mitocondrias, tiene lugar la formación de radicales libres. En este proceso, conocido como fosforilación oxidativa, es generada la energía necesaria para que se pueda

producir ATP. La cadena de transporte de electrones es el mecanismo clave del metabolismo aeróbico, donde el oxígeno actúa como aceptor final de los electrones, lo que posibilita la continuidad del sistema energético. Sin embargo, entre el 1 y 5 % de las moléculas de oxígeno se activa, formando el radical superóxido. Esto es ocasionado porque la cadena de transporte de electrones presenta centros redox que transfieren electrones al oxígeno [Fernández et al., 2009].

### Metabolismo anaeróbico celular

En el marco del metabolismo anaeróbico celular el flujo sanguíneo se reparte hacia los músculos ejercitados (en contracción) y hacia otros tejidos preferentes como son el cerebro y el corazón. Como consecuencia, otros órganos, como por ejemplo el hígado y los riñones, pueden verse sometidos a hipoxia, en mayor o menor medida. Cuando finaliza el ejercicio, los tejidos reciben una gran afluencia de oxígeno debido al retorno del flujo sanguíneo normal. Conocemos como isquemia-reperfusión a todo este proceso, que es la principal fuente de radicales libres del metabolismo anaeróbico celular. La formación del radical anión superóxido es catalizada por el sistema xantino-oxidasa del que hablaremos más adelante [Fernández et al., 2009].

### Sistemas enzimáticos productores de radicales libres

En nuestro organismo, existen diversos sistemas enzimáticos que desempeñan un papel clave en la generación de radicales libres. A continuación, se presentan algunos de estos sistemas enzimáticos productores de los radicales libres más importantes:

- **NADPH oxidasa:** se considera que la familia de la NADPH oxidasa es una fuente destacada de radicales libres. Se conoce también que en enfermedades como la diabetes 1 y 2 o la hipertensión, es responsable de la producción de radicales libres. La creación de radicales libres se lleva a cabo mediante la transferencia de electrones del NADPH al oxígeno, produciendo de este modo el radical anión superóxido [Carvajal, 2019]. La NADPH oxidasa es una enzima proteica multimérica. Las subunidades encargadas de la transferencia de los electrones se denominan gp91phox, nox1 y nox2. La llamada p22phox es la encargada de estabilizar la subunidad a la membrana plasmática, y por último las subunidades reguladoras son p67phox, p40phox y p47phox [Pacheco, 2011] (Figura 3.4).

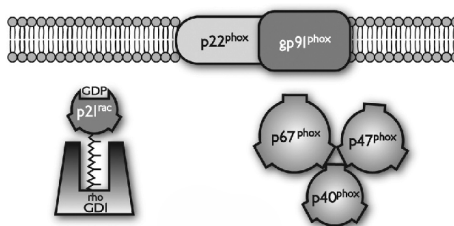


Figura 3.4: Estructura de la NADPH oxidasa [Álvarez Cardona et al., 2009]

- **Xantina oxidasa:** enzima citosólica que se encarga de catalizar la reacción de oxidación de hipoxantina a xantida y ácido úrico. Podemos encontrarla bajo dos configuraciones que tienen diferentes funciones, pero son interconvertibles. La primera forma es la xantina oxidasa que es la productora principal de anión superóxido cuya actividad incrementa en enfermedades como la diabetes, en desordenes autoinmunes y procesos inflamatorios [Carvajal, 2019]. La segunda forma es la xantina deshidrogenada que es la que genera xantina oxidasa a partir del elevado nivel de calcio que tiene lugar en la isquemia. Al mismo tiempo es generada a partir de ATP la hipoxantina que se oxida a xantina tras la entrada de oxígeno y se crea el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.
- **Mieloperoxidasa:** enzima productora de ácidos hipohalogenosos, mayormente el ácido hipocloroso, al igual que de otras moléculas que derivan del peróxido de hidrógeno. Esta enzima se almacena en neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y monocitos. Además, se ha observado un aumento en los niveles de mieloperoxidasa en venas varicosas, lo que lleva a pensar que podría desempeñar un papel en las etapas iniciales de la formación de estas gracias a la producción de radicales libres. Es también responsable de la actividad microbicida [García Morales et al., 1998].
- **Sintasa de óxido nítrico:** pertenece a la familia de enzimas óxido nítrico sintetasas que son las encargadas de generar óxido nítrico a partir de oxígeno, L-arginina y NADPH. Está presente en las neuronas, plaquetas, células musculares lisas, etc. En condiciones específicas, esta enzima es capaz de generar el anión superóxido el cual puede combinarse con óxido nítrico para dar lugar al anión peroxinitrito [Carvajal, 2019] (Figura 3.5). Podemos distinguir tres isoformas de esta enzima, la I, la II y la III.



Figura 3.5: Reacción del anión peroxinitrito [Bueno, 2015]

### Sistemas no enzimáticos productores de radicales libres

Además de los sistemas enzimáticos productores de radicales libres, existen también sistemas no enzimáticos productores de radicales libres en el organismo. Una de las principales fuentes no enzimáticas de radicales libres es la reacción de Fenton (Figura 3.6), donde el peróxido de hidrógeno reacciona con iones de metales de transición, como pueden ser el hierro o el cobre, para producir el radical hidroxilo. Del mismo modo, el radical superóxido participa en la reacción de Haber-Weiss (Figura 3.6), que combina la reducción del hierro oxidado por parte del radical superóxido con la reacción de Fenton (Figura 3.6), lo que produce también radical hidroxilo [Valko et al., 2007].

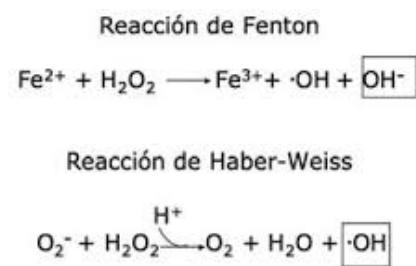


Figura 3.6: Reacción de Fenton y de Haber-Weiss [Macedo-Márquez, 2012]

### Agentes ambientales productores de radicales libres

Como ya conocemos, el organismo también está expuesto a distintas fuentes externas de radicales libres, como el ozono y el humo del tabaco. El ozono es un gas contaminante que se encuentra presente en la atmósfera, sobre todo en áreas urbanas, y su reacción con distintos compuestos orgánicos produce radicales libres. Por otro lado, el humo del tabaco presenta una amplia variedad de sustancias oxidantes, como son el monóxido de carbono y los radicales libres derivados del alquitrán. Otros agentes ambientales que pueden contribuir a la formación de radicales libres son la radiación ultravioleta al igual que algunos pesticidas [Valko et al., 2007].

### 3.3. Mecanismos de defensa antioxidantes

Se considera que un antioxidante es una molécula estable capaz de donar un electrón a un radical libre para conseguir su neutralización y de este modo reducir su poder nocivo sobre nuestro organismo. Estos trabajan neutralizando los radicales libres para poder terminar las reacciones en cadena y que no se produzca daño oxidativo.

Algunos de estos antioxidantes son el glutatión, las enzimas y el ácido úrico que son producidos por nuestro propio organismo. Sin embargo, otros como el ácido ascórbico o el tocoferol se obtienen con una correcta alimentación. Dependiendo del tipo de antioxidante, la neutralización de radicales libres se puede llevar a cabo mediante la donación de electrones o hidrógeno, la descomposición de peróxidos, inhibiendo enzimas, regulando la expresión génica, desactivando el anión oxígeno, etc [Vázquez Tarragón, 2016]. Los antioxidantes actúan a tres niveles que se describen a continuación:

- Antioxidación preventiva: se imposibilita la formación de nuevos radicales libres.
- Neutralización de radicales libres: se neutralizan los radicales libres con el fin de detener la cadena de iniciación o eliminar la cadena de reacciones de propagación.
- Reparación y antioxidantes de novo: se eliminan las proteínas oxidadas para imposibilitar la acumulación de residuos.

Se pueden clasificar los antioxidantes del siguiente modo:

#### 1. Mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos:

- **Superóxido dismutasa:** forma la principal defensa de la célula para la proliferación del radical anión superóxido. Se ubican en la mayoría de células aeróbicas y en los fluidos extracelulares. La superóxido dismutasa logra la reacción de desproporción del anión superóxido con la producción de anión oxígeno y peróxido de hidrógeno. Se distinguen tres grupos en función del metal que usan como molécula auxiliar: las superóxido dismutasas 1 que se localizan en el citoplasma y presentan cobre y zinc, las superóxido dismutasas 2 que se encuentran en la mitocondria y contiene magnesio, y por último las superóxido dismutasas 3 que se ubican en los fluidos extracelulares y están formadas con cobre y zinc [Pacheco, 2011] [Vázquez Tarragón, 2016].

- **Catalasa:** se ubica mayoritariamente en el hígado, aunque también se puede encontrar a lo largo de todo el organismo. Lleva a cabo la descomposición del peróxido de hidrógeno, convirtiéndolo en anión oxígeno y agua. Impide de este modo la producción de radicales hidroxilo que se forman debido a la interacción del peróxido de hidrógeno con metales de transición como el cobre y el hierro. Esta enzima es complementaria a las superóxido dismutasas. La actividad de esta enzima depende del tejido donde se encuentre, es muy escasa por ejemplo en el corazón y el cerebro, tiene actividad media en el pulmón y es muy alta en el hígado, como se ha mencionado anteriormente [Pacheco, 2011] [Vázquez Tarragón, 2016].
- **Sistemas glutatión:** aunque en este grupo también encontramos el glutatión y la glutatión-reductasa, la más reseñable es la glutatión-peroxidasa. Esta enzima presenta 4 moléculas auxiliares de selenio y desempeña un rol protector de vital importancia para las membranas frente a la peroxidación lipídica. Cataliza la degradación de los hidroxiperóxidos orgánicos a alcoholes y agua y la degradación de peróxido de hidrógeno a agua. Se pueden distinguir cuatro tipos de glutatión-peroxidasa, la citosólica, la de hidroxiperóxidos de fosfolípidos, la plasmática y la forma gastrointestinal [Pacheco, 2011] [Vázquez Tarragón, 2016].

## 2. Mecanismos de defensa antioxidante no enzimáticos exógenos y endógenos:

- **Ácido ascórbico (Vitamina C):** método de defensa exógeno ya que debe de integrarse a través de la dieta puesto que el organismo no puede sintetizarlo. Se trata de un monosacárido antioxidante. Muestra una disposición donde los grupos hidroxilos actúan como potentes agentes reductores, permitiéndole participar en la reducción del oxígeno, lo que hace que su función sea la de sustrato donador en las reacciones de las peroxidasas [Vázquez Tarragón, 2016].
- **Glutatión:** se puede localizar en grandes cantidades en el núcleo celular, el citosol y las mitocondrias, lo que lo convierte en el principal mecanismo de defensa antioxidante de estos orgánulos. Se produce en el citosol por la glutamato-cisteína ligasa y la glutatión sintetasa para ser enviado a las mitocondrias. Aunque sea un producto celular, es posible su exportación hacia espacios extracelulares como el plasma. Su función protectora

se basa en su agregación como cofactor para enzimas como la glutatión transferasa, en su alta capacidad regenerativa de antioxidantes tales como la vitamina E o el ácido ascórbico y en su implicación en el transporte de aminoácidos. Está compuesto por lisina, ácido glutámico y cisteína y es de vital importancia debido a su alta concentración y a su participación en el mantenimiento del estado de óxido-reducción celular [Meister, 1988] [Vázquez Tarragón, 2016].

- **Vitamina E:** nombre utilizado comúnmente para dirigirse a un grupo de ocho tocoferoles y tocotrienoles que son vitaminas liposolubles relacionadas entre sí con alto poder antioxidante. El organismo humano capta la vitamina E más fácilmente de la forma  $\alpha$ -tocopherol, lo que lo convierte en el antioxidante liposoluble con mayor importancia. Su función es interrumpir la continuidad de la reacción de propagación eliminando los radicales intermediarios. Forma parte de los métodos de defensa exógenos ya que debe ser obtenida mediante la dieta, puesto que el organismo no la produce en cantidades suficientes por sí solo [Vázquez Tarragón, 2016].

### 3.4. Biomarcadores de estrés oxidativo

Se conoce como biomarcador a una molécula biológica que se encuentra presente en la sangre, otros fluidos corporales o tejidos del organismo. Su presencia y sus niveles pueden ser indicativos de un proceso fisiológico normal, un estado patológico o la respuesta a un tratamiento. Es por esto que se utilizan como herramientas de diagnóstico, pronóstico y monitorización de enfermedades y afecciones. Su medición y análisis puede proporcionar información muy útil sobre el estado de salud de un individuo, la progresión de una enfermedad o la eficacia de una intervención terapéutica [Biomarkers Definitions Working Group et al., 2001]. Un biomarcador de estrés oxidativo se utiliza para estudiar el daño oxidativo en el organismo, pues nos proporciona información sobre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante del cuerpo [Dalle-Donne et al., 2006]. Estos biomarcadores deben de cumplir una serie de condiciones para que se les pueda considerar válidos como biomarcadores de estrés oxidativo [Pacheco, 2011]:

1. **Estabilidad:** no debe ser una molécula susceptible de experimentar alteraciones, oxidación o pérdida durante la manipulación, procesamiento, análisis y almacenamiento de la muestra

2. **Relevancia fisiopatológica:** debe ser una molécula que esté directamente relacionada en el inicio y/o progresión de la enfermedad.
3. **Accesibilidad:** debe ser una molécula que esté presente en el tejido diana o en un sustituto adecuado que pueda reflejar correctamente la modificación oxidativa del tejido en cuestión.
4. **Concentración adecuada:** debe ser una molécula que esté presente en concentraciones significativas.
5. **Especificidad:** debe ser una molécula específica para las especies reactivas y que no pueda presentar modificaciones debidas a la dieta.
6. **Cuantificación fiable:** debe ser una molécula cuantificable a través de un ensayo concreto.
7. **Facilidad de detección:** debe ser una molécula de fácil detección y medición.
8. **Estabilidad temporal:** debe ser una molécula que mantenga las concentraciones más o menos constantes a lo largo del tiempo.

Los biomarcadores de estrés oxidativo pueden dividirse en los siguientes grupos:

- **Biomarcadores de oxidación proteica:** dentro de este grupo cabe destacar los carbonilos proteicos que son creados debido a la oxidación de residuos de aminoácidos como la arginina, lisina, prolina, y treonina o debido a la reacción secundaria con derivados de la oxidación de azúcares y lípidos. Su detección en grandes cantidades puede ser indicio de disfunciones asociadas a cierta enfermedad, como por ejemplo en el caso de enfermedades neurodegenerativas [Vázquez Tarragón, 2016].
- **Biomarcadores de oxidación lipídica:** el malondialdehído es un biomarcador utilizado para evaluar la peroxidación lipídica en el cuerpo humano. Es un producto que deriva de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados, en especial el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico, cuando son atacados por especies reactivas de oxígeno y radicales libres [Ayala et al., 2014]. El malondialdehído interactúa con proteínas y ácidos nucleicos, creando daño oxidativo a estas mismas. Gracias a su alta reactividad y a su fácil difusión a través de las membranas, actúa como mensajero de los efectos perjudiciales del estrés oxidativo en distintos orgánulos celulares y tejidos [Uchida, 2003].



- **Biomarcadores de oxidación de ADN:** la 8-oxo-2-desoxiguanosina es un producto de la oxidación de bases de guanina que tiene lugar cuando las especies reactivas de oxígeno reaccionan con el material genético. Funciona como marcador del daño oxidativo en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se sabe que en pacientes con cáncer, diabetes o distintas enfermedades neurodegenerativas se pueden encontrar niveles altos de este biomarcador [Valavanidis et al., 2009] [Vázquez Tarragón, 2016].

### 3.5. Estrés oxidativo y salud humana

Distintos estudios han logrado relacionar el estrés oxidativo y la acción de los radicales libres con el desarrollo y la progresión de distintas enfermedades o procesos degenerativos. Si bien los mecanismos no son los mismos para todas las patologías, se puede generalizar que el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante del organismo puede ser un factor importante en el origen de distintas enfermedades. Algunas de estas patologías que están relacionadas con el estrés oxidativo son las siguientes [Elejalde Guerra, 2001]:

- **La aterosclerosis:** la formación de la placa aterosclerótica se ha relacionado con la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad por radicales libres lo que podría iniciar y propagar el proceso aterogénico.
- **La hipertensión arterial:** aunque los mecanismos no están del todo claros, ciertos datos experimentales y clínicos apuntan a que el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de hipertensión.
- **El envejecimiento:** se ha observado una menor actividad proteolítica, una disminución de antioxidantes y una inactivación de enzimas detoxificadoras de especies reactivas de oxígeno en células envejecidas.
- **Las enfermedades neurodegenerativas:** algunas patologías como el Parkinson o el Alzheimer están relacionadas con un aumento del estrés oxidativo y del daño oxidativo en el sistema nervioso central.
- **La diabetes:** la hiperglucemia crónica en la diabetes puede generar estrés oxidativo, que acelera el desarrollo de complicaciones propias de esta patología como son la retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética.

### 3.6. Estrés oxidativo y deporte

El ejercicio físico, tanto aeróbico como anaeróbico, puede llegar a desencadenar un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidante del organismo, causante del estrés oxidativo [Fernández et al., 2009].

La duda general que surge entonces es si el ejercicio es realmente saludable, puesto que, aunque es sabido que el sedentarismo es un factor de riesgo importante para diversas enfermedades [Matamoros, 2019], la práctica de ejercicio conlleva también un aumento significativo en la generación de radicales libres.

Como ya sabemos, el estrés oxidativo aparece cuando existe un desequilibrio entre la capacidad antioxidante del organismo y la producción de radicales libres, pero estos últimos no siempre desempeñan papeles nocivos ya que actúan también como mensajeros celulares. Debido al aumento en el consumo de oxígeno durante el ejercicio, tiene lugar un aumento de producción de radicales libres [Fernández et al., 2009], lo que puede llevar a hacernos pensar que el ejercicio es perjudicial para el organismo.

Sin embargo, una práctica regular de ejercicio moderado potencia notablemente las defensas antioxidantes y aporta una mayor resistencia al estrés oxidativo [Sureda, 2018]. Esto es debido a la adaptación del organismo a los estímulos oxidantes recurrentes causados por el ejercicio aeróbico y anaeróbico. Estudios demuestran que sujetos entrenados son menos propensos al estrés oxidativo tras una sesión de ejercicio agudo ya que presentan una mayor activación y síntesis de enzimas antioxidantes.

En conclusión, el ejercicio físico regular y bien planificado actúa como un estímulo antioxidante, mientras que el ejercicio extenuante y acumulado en el tiempo puede contribuir a la fatiga y al estrés oxidativo [Sureda, 2018], como se muestra en la figura 3.7 (Figura: 3.7).

### 3.7. Crossfit

En el contexto de este Trabajo de Fin de Grado, es importante comprender el papel del estrés oxidativo y las adaptaciones antioxidantes ya que los deportistas de Crossfit combinan generalmente ejercicios de alta intensidad tanto aeróbicos como anaeróbicos.

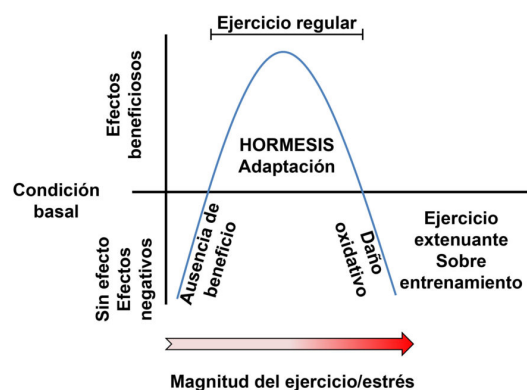


Figura 3.7: Esquema del deporte y el estrés oxidativo [Sureda, 2018]

El Crossfit es un sistema de entrenamiento que se caracteriza por su variación de ejercicios combinado con movimientos intensos de tipo funcional [Vásquez et al., 2017]. Debido a la variabilidad en los ejercicios y la intensidad de los movimientos, puede provocar un notable aumento en la masa mitocondrial, impulsado por el principio de confusión muscular. Este incremento puede verse relacionado con un mayor consumo de ácido láctico y mayor trabajo muscular. No obstante, aunque tenga ventajas importantes sobre el estado físico del deportista, presenta también alto riesgos de lesiones.

Este deporte, caracterizado por ejercicios de alta intensidad y versatilidad, deriva en el estudio de como la suplementación con probióticos podría ser una estrategia interesante para modular el equilibrio redox y mejorar la capacidad de respuesta al estrés oxidativo inducido por este entrenamiento intensivo.

### 3.8. Estado del arte y trabajos relacionados

Desde tiempos pasados, las creencias populares han asegurado que la realización de ejercicio solo tenía repercusiones positivas sobre nuestro organismo. Pese a esto, y según el conocimiento científico, se puede afirmar que las consecuencias del deporte no son exclusivamente beneficiosas. Distintos estudios han mostrado que el desempeño de actividad física no es siempre beneficioso para la salud, puesto que sabemos que puede llevar a la formación

de radicales libres, que en ciertos casos desembocará en estrés oxidativo. A continuación, voy a detallar estudios científicos de interés en torno a la problemática tratada.

Gracias a la revisión sistemática del impacto de los probióticos en el rendimiento de los atletas de resistencia [Díaz-Jiménez et al., 2021], se estudió el impacto de la suplementación con probióticos sobre el rendimiento de atletas de resistencia. Los numerosos autores de este estudio llevaron a cabo una amplia y exhaustiva búsqueda en distintas bases de datos (PubMed, Web of Science, Scopus, Sportdiscus y Embase) para hallar distintos ensayos clínicos aleatorizados y de buena calidad que cumplieran con los criterios de inclusión. Se seleccionaron los estudios independientemente del país de publicación, la institución o investigador individual y si el idioma de publicación era inglés o español. Se limitó el rango de búsqueda a los últimos cinco años antes del estudio (2016-2020). Se logró recopilar un total de nueve estudios con 243 participantes, cuatro para hombres y mujeres y cinco solo para hombres. Se evaluaron múltiples cepas de probióticos, duraciones de suplementación y dosis. Las medidas de rendimiento deportivo se establecieron como resultados primarios mientras que se seleccionaron parámetros inmunológicos, inflamatorios, de estrés oxidativo y de función gastrointestinal como resultados secundarios.

Tras finalizar esta revisión sistemática se obtuvieron los siguientes hallazgos:

- La suplementación con probióticos mejoró notablemente algunas facetas del rendimiento deportivo, como por ejemplo la capacidad aeróbica y la resistencia en atletas.
- Los probióticos regularon la respuesta inmune, de modo que en los sujetos disminuyeron los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentaron las antiinflamatorias tras el ejercicio intenso.
- La suplementación fue eficaz para obtener una mejoría notable de la función de barrera intestinal y una reducción de los síntomas gastrointestinales causados por el ejercicio.
- La suplementación con probióticos (*Lactobacillus plantarum* PS128) provocó una disminución del estrés oxidativo en los atletas.
- Sin embargo, no se produjeron hallazgos de los efectos de los probióticos sobre la incidencia de infecciones del tracto respiratorio superior.

- Por último, no se encontraron efectos adversos tras el uso de probióticos como suplementos en deportistas de resistencia.

Los autores del estudio concluyeron que la suplementación con probióticos puede ser una estrategia nutricional prometedora para mejorar el rendimiento, la recuperación y la salud de los atletas de resistencia. No obstante, debido a la poca evidencia científica, se necesitan más estudios para confirmar estos hallazgos y determinar las cepas, dosis y protocolos óptimos de suplementación.

Sin embargo, el estudio de los efectos de la suplementación con probióticos y vitamina D3 en los marcadores de rendimiento deportivo en atletas masculinos de artes marciales mixtas [Przewłócka et al., 2023] tuvo como objetivo la investigación de los efectos de la suplementación con probióticos y vitamina D sobre el rendimiento anaeróbico y el metabolismo del lactato en atletas de artes marciales mixtas. Se llevó a cabo una investigación clínica aleatorizada, de doble ciego y con placebo como control. Tuvo una duración de cuatro semanas y constaba de 23 atletas masculinos divididos en dos grupos. Al primer grupo se le suplementó solo con vitamina D (doce sujetos) mientras que el segundo grupo recibió probióticos y vitamina D (once sujetos). Se les realizaron mediciones repetidas de la tasa de utilización de lactato, del nivel de creatina quinasa y el rendimiento anaeróbico.

Este estudio reveló los siguientes aspectos:

- En comparación con el grupo que solo recibió vitamina D, la suplementación con probióticos y vitamina D mejoró notablemente el trabajo total y la potencia media durante los primeros 30 segundos de ejercicio de sprints máximos.
- El grupo que recibió probióticos y vitamina D mostró una mejoría en la utilización del lactato sanguíneo para la recuperación después del ejercicio intenso, en comparación con el grupo que solo recibió vitamina D.
- En cuanto a los niveles de creatina quinasa, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos
- Se observaron también concentraciones séricas elevadas de vitamina D después del ejercicio de sprint máximo en ambos grupos.

Los autores de la investigación concluyeron que la suplementación de probióticos y vitamina D sobre el rendimiento anaeróbico y el metabolismo

del lactato tendría efectos positivos además de estar relacionada con cambios en la composición de la microbiota intestinal, lo que podría mejorar la adaptación al entrenamiento intensivo y la función muscular de los atletas. Este primer estudio descrito es de vital importancia para la recopilación de trabajos relacionados con el tema de este Trabajo de Fin de Grado ya que, al ser una revisión sistemática, engloba una multitud de estudios que fueron previamente filtrados para analizar la suplementación con probióticos.

Según el estudio del estrés oxidativo inducido por el ejercicio de la Revista Andaluza de Medicina del Deporte [Fernández et al., 2009], que se centró en el análisis del efecto de la suplementación con carbohidratos (glucosa y fructosa) sobre el estrés oxidativo inducido por el ejercicio físico, se observó que la suplementación con glucosa y fructosa suministrada antes de la realización de ejercicio aeróbico moderado provocó un aumento notable del estrés oxidativo durante y después del esfuerzo. Sin embargo, el aumento del estrés oxidativo no fue notable cuando los sujetos realizaron solo ejercicio glucolítico o recibieron únicamente glucosa antes del ejercicio. Se concluyó que la fructosa, que se encuentra habitualmente en bebidas y alimentos deportivos, puede ocasionar un impacto negativo sobre el estrés oxidativo inducido por el ejercicio, que a su vez podría tener consecuencias relevantes para la nutrición y suplementación deportiva.

Otro estudio de los efectos de la suplementación con probióticos sobre el sistema inmunitario en deportistas de alto rendimiento, que consistió en una revisión bibliográfica [Delgado Ovejero, 2020], reveló que dicha suplementación en atletas de élite mejoró la funcionalidad del sistema inmunitario, que estaba previamente debilitado a causa del sobreentrenamiento. Los probióticos que mejoraron la función inmunitaria fueron las bacterias del ácido láctico, concretamente *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium*.

Por otro lado, el estudio sobre el efecto de la administración oral diaria de *Lactobacillus plantarum* PS128 sobre la recuperación de la capacidad de ejercicio después de una media maratón [Fu et al., 2021], investigó el efecto de la misma cepa de probiótico (*Lactobacillus plantarum* PS128) que se ha utilizado en este TFG sobre la capacidad de ejercicio y la adaptación fisiológica después de una media maratón. Se llevó a cabo un ensayo cruzado, aleatorizado y de doble ciego con ocho corredores de media maratón que recibieron dos cápsulas ( $3 \times 10^{10}$  UFC por cápsula) de probiótico, una cada mañana y otra cada noche antes de las comidas, o dos cápsulas de placebo, durante 4 semanas. Se estudió la capacidad de ejercicio (la fuerza muscular y explosiva de las extremidades inferiores, la potencia anaeróbica y la capacidad aeróbica) y se realizaron análisis de sangre para determinar

la fatiga y el daño muscular, el estrés oxidativo y el daño renal en diferentes momentos (antes de la suplementación, 48 horas antes de la media maratón y 0, 3, 24, 48, 72 y 96 horas después de la misma). Los resultados obtenidos con el ensayo relacionaron la suplementación con *Lactobacillus plantarum* PS128 con una mejora en el daño muscular, el daño renal y el estrés oxidativo causados por la media maratón. Más concretamente, se detectaron niveles más bajos de mioglobina y creatina fosfoquinasa, se observó una recuperación más rápida del nitrógeno ureico en sangre y unos niveles más altos de superóxido dismutasa en el grupo suplementado.

La relación del estudio descrito resulta particularmente relevante para este TFG ya que investiga el efecto de la misma cepa probiótica sobre el estrés oxidativo, entre otros, aunque en un deporte distinto. Los hallazgos descritos sugieren que *Lactobacillus plantarum* PS128 podría ser beneficioso para la disminución del estrés oxidativo causado por el ejercicio intenso, aunque sus efectos podrían verse alterados según el tipo de ejercicio estudiado.

A su vez, la revisión sobre el microbioma intestinal y sus consecuencias en el rendimiento deportivo [Crowson and McClave, 2020] estudió en profundidad el papel de los probióticos en el ejercicio y el rendimiento deportivo mediante el análisis de las evidencias científicas disponibles. La revisión destacó que los probióticos pueden influir en el rendimiento deportivo a través de la modulación del sistema inmune, la mejora de la función de la barrera intestinal y la reducción de la inflamación, lo que indicaría que los probióticos podrían tener efectos beneficiosos para los atletas. Otro importante hallazgo relacionado con este TFG fue la evidencia de que, ciertas cepas probióticas podrían tener influencia en las vías metabólicas relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación. Esto podría significar una mejora en la capacidad antioxidante del organismo mediante la producción de metabolitos específicos y la regulación de la microbiota intestinal, aunque estos efectos dependan de la cepa estudiada. Los autores de esta revisión destacaron también las grandes limitaciones de la literatura existente en cuanto a este tipo de estudios (la heterogeneidad de los estudios y las diferentes cepas y dosis estudiadas) y indicaron la necesidad de llevar a cabo más investigaciones, concretamente el desarrollo de estudios muy controlados que analicen los efectos específicos de cada cepa en distintos tipos de deportistas.

Esta revisión es especialmente relevante para este TFG puesto que nos proporciona unas bases teóricas sólidas sobre los mecanismos por los cuales los probióticos podrían tener consecuencias sobre el estrés oxidativo. Además, detalla las áreas donde se necesita más investigación en este campo, como es el caso de los atletas de Crossfit (estudio de los efectos en distintos tipos de deportistas).

Por último, en una revisión realizada en el grupo de investigación [Santibañez-Gutierrez et al., 2022] sobre los efectos de la suplementación probiótica sobre el ejercicio con predominio del metabolismo aeróbico en población entrenada, se estudiaron los efectos de la suplementación probiótica en el rendimiento aeróbico de atletas, jugadores de primera división y población entrenada (más de 8 horas a la semana o más de 5 entrenamientos a la semana) gracias a una revisión sistemática, un meta-análisis y un meta-regresión de ensayos publicados en bases de datos científicas. Todos estos ensayos investigaban el impacto de distintas cepas de probióticos suministradas en diferentes dosis y duraciones. Esta revisión encontró que la suplementación con probióticos mejoró significativamente el consumo máximo de oxígeno de los individuos, lo que aumentaría su capacidad aeróbica. Además, se observó un notable aumento en el tiempo hasta el agotamiento de los deportistas lo que significaría una mayor resistencia al esfuerzo prolongado y se detectó una reducción de los marcadores de daño muscular y estrés oxidativo, que indicaría una mejor recuperación post-ejercicio de los sujetos. La conclusión a la que se llega con esta revisión sistemática es que los probióticos podrían mejorar notablemente el rendimiento aeróbico y favorecer la adaptación al entrenamiento en deportistas. Sin embargo, una vez más los investigadores destacaron la importancia de más investigaciones sobre la suplementación probiótica, puesto que los efectos pueden variar mucho dependiendo de la cepa utilizada, la dosis y la duración de la intervención.

Esta revisión es también relevante para este TFG ya que proporciona evidencias científicas sobre los beneficios de los probióticos en la capacidad aeróbica y la recuperación de los deportistas. Si bien es cierto que no se centra en deportistas de Crossfit, los hallazgos podrían servir también para esta disciplina, ya que se combinan ejercicios de alta intensidad con otras actividades de resistencia.

Se concluye entonces que la evidencia actual acerca de este tema en el contexto de los deportistas de Crossfit es limitada, pero no en otras modalidades deportivas. De este modo, varios de los autores de los estudios ya mencionados, hacen hincapié que la necesidad de más estudios de calidad que determinen las cepas, dosis y protocolos óptimos de suplementación con probióticos en la población atlética, problema que se afronta en este TFG.



---

# Metodología

---

## 4.1. Descripción de los datos

### El estudio

Como ya hemos visto en la introducción, este estudio se enmarca en el proyecto “Efecto de los probióticos en el rendimiento deportivo y el daño intestinal en los integrantes del club de Crossfit Bikain”.

Esta investigación ha sido aprobada por parte del Comité de Ética para las investigaciones con seres humanos, sus muestras y sus datos (CEISH) de Universidad del País Vasco que y consideró que:

1. El estudio se justifica debido a que sus objetivos permitirán profundizar el conocimiento y serán beneficiosos para la sociedad, lo que hace aceptables las molestias y riesgos que puedan darse.
2. El equipo de investigadores y los recursos disponibles son correctos para el desarrollo de la investigación.
3. El planteamiento del estudio cumple con los requisitos metodológicos y éticos imprescindibles para su ejecución, ya que siguen los criterios de buenas prácticas de la investigación científica.
4. Por último, se respetan las autorizaciones, la normativa vigente y los acuerdos o convenios necesarios para llevarse a cabo.

Por todo lo enumerado, el CEISH de la Universidad del País Vasco emitió el 23 de junio de 2022 el informe favorable (M10\_2022\_199) para la realización de dicha investigación

Estamos ante un estudio doble ciego paralelo con 24 sujetos divididos aleatoriamente en dos grupos: el grupo CONTROL que consta de 10 participantes que reciben placebo (cápsula de 2g de dextrosa) y el grupo PROBIÓTICO formado por 14 sujetos suplementados con  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Lactobacillus plantarum* PS128 de la marca Swandson durante cuatro semanas, siguiendo sus entrenamientos habituales. A los deportistas se les realizaron una serie de pruebas de rendimiento antes de comenzar el periodo de suplementación y también al final del mismo. Es importante señalar que, aunque inicialmente la investigación contemplaba la participación de 33 individuos, por razones de índole personal, 9 de ellos no lograron completar el estudio de manera adecuada.

El club deportivo se encargó de la extracción de sangre y las muestras llegaron a la Universidad de Burgos anonimizadas. El plasma de dichas muestras fue extraído por otro integrante de la Universidad de Burgos a las 24h de la recepción manteniéndose a 4°C hasta el momento preciso de la extracción. Las muestras de plasma se alicuotizaron (para evitar el daño de los ciclos de congelación y descongelación) y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Concluyendo, para el correcto desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado, se ha trabajado con muestras plasmáticas de 33 individuos. Mas precisamente, se debería haber trabajado con 4 muestras de plasma por sujeto, una muestra en estado basal sin suplementación, una muestra post-ejercicio sin suplementación, una muestra en estado basal con suplementación (probiótico o placebo) y una muestra post-ejercicio con suplementación (probiótico o placebo), lo que suma un total de 132 muestras plasmáticas. Debido a las dificultades propias de una investigación de este tipo, no todos los sujetos completaron el estudio de manera adecuada, por lo que el numero total de muestras de plasma recibidas y analizadas fue de 92 (realizándose cada ensayo por duplicado). Una vez desvelado el doble ciego, se observó que solo 24 de los 33 sujetos totales habían completado el estudio adecuadamente por lo que a la hora de realizar el análisis de los resultados experimentales y para mantener lo más elevado posible el tamaño muestral, hubo que limitarse a utilizar únicamente los datos post-ejercicio, antes y después de la suplementación de estos 24 individuos, ya que faltaban numerosas muestras de estado basal.

## Sujetos de la investigación

Los sujetos de este estudio fueron tanto hombres como mujeres que se repartieron equitativamente entre los dos grupos ya explicados. El total de participantes del ensayo fue de 33 individuos entre los cuales 9 sujetos no

lograron completar el estudio adecuadamente. La dieta de todos ellos fue una dieta mediterránea pautada por el nutricionista del centro con especial limitación de alimentos fermentados, derivados lácteos que contuvieran probióticos (kefir, yogur, etc.) y suplementos alimenticios, garantizando su estricto cumplimiento y evitando así diferencias en la alimentación entre los distintos individuos. El reclutamiento fue llevado a cabo por el profesor Juan Francisco Mielgo (Profesor Titular del área de Fisiología de la Universidad de Burgos).

Los criterios de inclusión en el estudio fueron los siguientes:

- Los participantes debían ser mayores de edad y tenían que haber practicado Crossfit durante al menos un año.
- Los participantes debían entrenar al menos dos veces a la semana en el club deportivo.

Los criterios de exclusión fueron los que se mencionan a continuación:

- Haber padecido alguna lesión durante los seis meses previos al inicio de la investigación.
- Padecer alguna enfermedad de tipo crónica (por ejemplo, la enfermedad de Chron).
- Tomar cualquier tipo de medicación, alcohol, tabaco y cualquier alimento considerado probiótico durante la investigación.

## **Variables de la investigación**

A pesar de haber variables demográficas tales que el sexo y la edad y otras relacionadas con el rendimiento deportivo, IMC, etc para la realización de este TFG únicamente se tendrán en cuenta como variables los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante evaluados en la Universidad de Burgos (los niveles de malondialdehído, de carbonilos, los niveles de glutatión reducido y oxidado y la capacidad antioxidante total por FRAP). Esto es debido a que este estudio está enfocado unicamente en los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante, ya que las distintas variables demográficas mencionadas forman parte de una tesis doctoral ya existente.

## 4.2. Técnicas y herramientas

Todos los estudios experimentales han sido realizados en el laboratorio de investigación en biomedicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Burgos [UBU, 2022]. Las técnicas utilizadas para la cuantificación de proteínas y de distintos biomarcadores han sido varias, en base los recursos disponibles y al resultado que se quería obtener.

Las técnicas metodológicas utilizadas para la realización de este TFG han sido las siguientes:

### 1. Técnicas para la cuantificación de proteínas:

- **Bradford:** fue implementado por el científico americano Marion Mckinley Bradford en 1976 [Sánchez Amador, 2021]. Se basa en la determinación de proteínas mediante la cuantificación de las mismas a la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 (Figura 4.1), que forma un complejo azul de distintas intensidades dependiendo de la concentración proteica de la muestra [Winkler, 2017]. La cuantificación de las proteínas se mide mediante espectrofotometría a 595 nm. Este método es muy popular debido a su rapidez, a la alta sensibilidad proteica y a su fácil utilización.

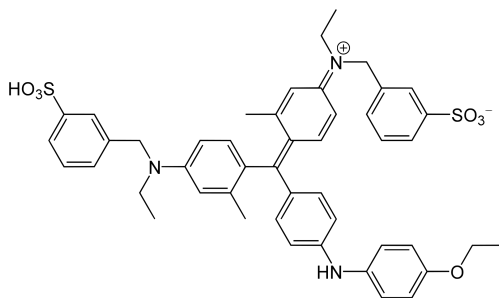


Figura 4.1: Estructura de resonancia de la molécula del azul de Coomassie G-250 [Bradford, 1976]

- **Nanodrop:** aunque la cuantificación espectrofotométrica con Nanodrop sirva también para la cuantificación de ácidos nucleicos, en este estudio se ha utilizado para la cuantificación de proteínas. Se basa en la cantidad lumínica que puede absorber la muestra a distintas longitudes de onda, midiendo así la concentración de proteínas totales sin distinguir su actividad. El Nanodrop es

un espectrofotómetro que mide de manera rápida y sencilla la absorbancia de gotas de muestra a 280 nm sin la necesidad de utilizar cubetas ya que solo necesita de un volumen de muestra de 1  $\mu\text{L}$  [IdiPaz, 2015]. Aunque es cierto que la cuantificación con Nanodrop tiene un error mayor que la cuantificación con Bradford, se ha utilizado dada la inmediatez y simplicidad con la que se obtienen los resultados, lo cual resulta muy conveniente para una estimación preliminar de la cantidad de proteínas plasmáticas.

## 2. Técnicas para la cuantificación de los carbonilos totales en plasma:

- La cuantificación de los carbonilos del plasma se ha llevado a cabo mediante la 2,4-dinitrofenilhidracina (Figura 4.2), que puede unirse covalentemente a los grupos carbonilos de las proteínas. Esta unión puede ser cuantificada mediante espectrofotometría a 370 nm [Irazusta et al., 2008].

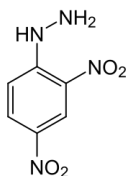


Figura 4.2: Estructura de la 2,4-dinitrofenilhidracina [Byjus, 2020]

## 3. Técnicas para la cuantificación de peroxidación lipídica:

- La cuantificación de niveles de malondialdehído (MDA) es un método ampliamente utilizado para determinar la peroxidación lipídica de una muestra. El malondialdehído es una de las principales sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico o TBA. Hay distintos métodos de detección del malondialdehído como la espectrofotometría con ácido tiobarbitúrico, la cromatografía de gases o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En este TFG se ha realizado el ensayo colorimétrico con ácido tiobarbitúrico al no requerir de equipamientos especializados. Este método consiste en la reacción del ácido tiobarbitúrico al ser atacado por el malondialdehído en sus grupos metilenos activos (Figura 4.3) y el posterior análisis en un espectrofotómetro de la absorbancia del cromógeno resultante a 530nm. El único defecto

que presenta este método es que el ácido tiobarbitúrico reacciona también con otros aldehídos, no solo con aquellos resultantes de la peroxidación lipídica (por ejemplo, la homocisteína y la glucosa) [Fagali, 2011].

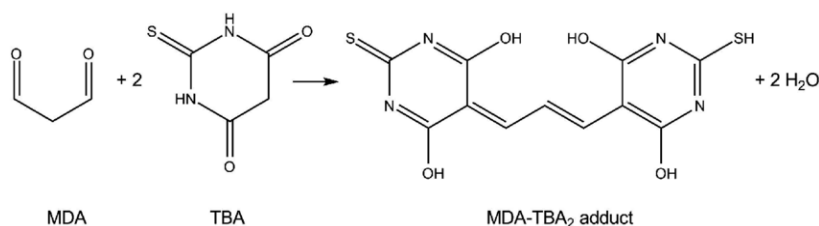


Figura 4.3: Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico [Weitner et al., 2016]

#### 4. Técnicas para la cuantificación de la capacidad antioxidante total:

- **Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP):** el ensayo conocido más comúnmente como FRAP se basa en cuantificación del nivel de reducción del ion férrico, que se encuentra en el reactivo FRAP, a ion ferroso debido a la presencia de antioxidantes en la muestra (Figura 4.4). El reactivo FRAP está compuesto por un buffer de ácido acético-acetato de sodio, de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina y tricloruro de hierro. La reducción forma un compuesto de color azul, cuya intensidad depende del poder antioxidante, que es medido mediante espectrofotometría a 593nm [Rioja Antezana et al., 2018].

#### 5. Técnicas para la cuantificación del glutatión reducido:

- **Glutatión Reducido (GSH):** para la cuantificación del glutatión reducido se utilizó un método basado en la fluorescencia producida por la reacción específica entre el glutatión reducido y el o-ftalaldehído (OPA) (Figura 4.5). Esta señal es posteriormente cuantificada mediante espectrofotometría de fluorescencia excitando a 360 nm y midiendo la emisión a 460 nm [Pacheco, 2011].

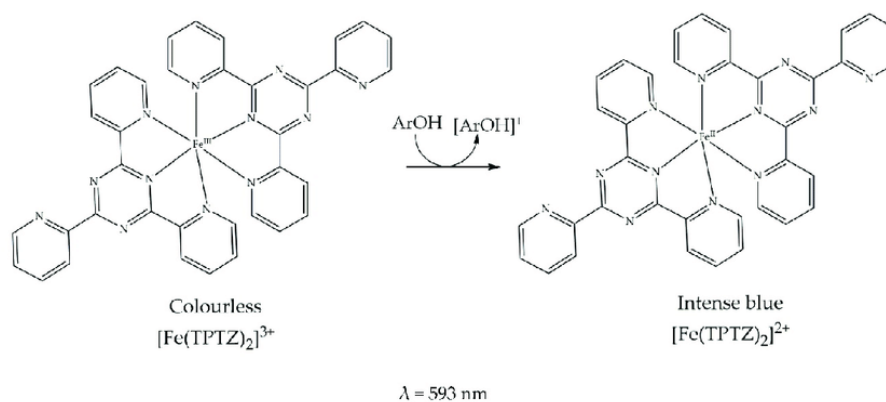


Figura 4.4: Reducción del ion férrico a ion ferroso [Sadeer et al., 2020]

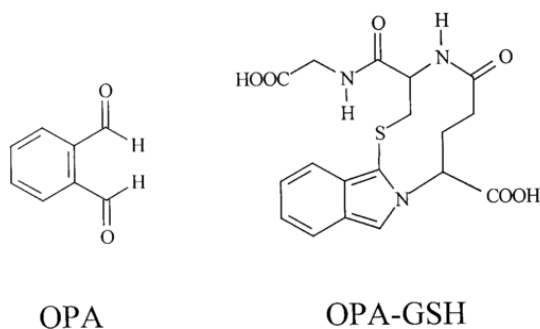


Figura 4.5: Reacción entre el glutatión reducido y el o-ftalaldehído [Tsikas et al., 1999]

## 6. Técnicas para la cuantificación del glutatión oxidado:

- Glutatión Disulfuro (GSSG):** Para la cuantificación del glutatión oxidado se utilizó el mismo método basado en la fluorescencia producida por la reacción específica entre el glutatión disulfuro y el o-ftalaldehído (OPA). Pero en este caso, se elimina el GSH presente en la muestra mediante N-etilmaleimida (NEM) que forma un compuesto que no reacciona con OPA. Esta señal es también cuantificada mediante espectrofotometría de fluorescencia excitando a 360 nm y midiendo la emisión a 460 nm [Pacheco, 2011].

Todas estas técnicas metodológicas quedan detalladas en el anexo G de este TFG, tanto sus protocolos experimentales para que dichas técnicas puedan ser reproducibles como sus curvas de calibrado y demás características.

Las herramientas que han sido utilizadas para el correcto desarrollo de este TFG son las que se describen brevemente a continuación:

**1. Software de lectura de microplacas y generación de imágenes Gen5:**

Este software ha sido diseñado por BioTek Instruments y es de gran utilidad para la lectura de microplacas y posterior producción de datos. Se ha utilizado para la medición espectrofotométrica de las muestras de manera rápida y sencilla. Además, una vez obtenidos los resultados, este software muestra directamente la opción de exportar los datos a una hoja de Microsoft Excel. Además, permite incorporar los datos de concentración del patrón, identificar los blancos, controles y muestras para incorporar el modelo adecuado para la curva/recta de calibración y poder así, cuantificar de manera automática el parámetro deseado a partir de los datos de absorción o fluorescencia [Stemart, nd].

**2. Microsoft Excel:**

Microsoft Excel es un potente software implementado por Microsoft que permite la organización, el análisis y la creación de datos mediante la edición de hojas de cálculo. En el campo de este TFG, se ha utilizado para la organización de los datos obtenidos tras las lecturas espectrofotométricas, el cálculo de unidades y la creación de rectas de calibrado [Microsoft, 2023] [Durán, 2023].

**3. Statgraphics 19:**

Statgraphics es un software de herramientas estadísticas muy completas para el análisis y estudio de datos también en formato de tablas. Se ha utilizado para el análisis estadístico de los datos obtenidos tras la investigación, pudiendo determinar el efecto de los probióticos sobre el estrés oxidativo en los atletas [Statgraphics, 2024].

**4. LaTeX:**

LaTeX es un sistema enfocado a creación de documentos escritos con una elevada calidad tipográfica. Se utiliza habitualmente para la redacción de artículos científicos y académicos ya que les proporciona una apariencia profesional. LaTeX ha sido utilizada para la redacción de esta memoria y sus anexos [Kopka and Daly, 2003].

**5. Overleaf:**



Overleaf es una plataforma online destinada a la redacción, edición y publicación colaborativa de documentos científicos. Esta plataforma es un editor de LaTeX enfocado a la simplificación y agilización de dichos documentos, además de ofrecer la posibilidad de editar documentos de forma colaborativa y a tiempo real. LaTeX ha sido utilizada para la redacción de esta memoria y sus anexos. [Universidad Carlos III de Madrid, 2024]

#### 6. BibTeX:

BibTeX es una herramienta utilizada para dar formato a referencias utilizadas posteriormente en LaTeX. En este caso, ha sido de gran utilidad para la elaboración de esta memoria, y se ha utilizado bajo el formato de extensión [Patashnik, 1984].

#### 7. GitHub:

GitHub es una plataforma online que se basa en el sistema de control de versiones Git. Está enfocada en la gestión, alojamiento y colaboración de proyectos de desarrollo de software. Además, provee un historial completo de los cambios que se realizan en los archivos del proyecto, permite la gestión de versiones, la integración de herramientas automatizadas y facilita el trabajo en equipo, todo ello dentro de lo que se conoce como un repositorio [GitHub, 2024]. GitHub se ha utilizado para almacenar todos los archivos que conforman este TFG (la memoria y los anexos en formato .pdf, el código fuente de la aplicación Shiny en formato .py, los archivos excel con los resultados de los ensayos en formato .xlsx y los análisis estadísticos en formato .sgp) y para facilitar la organización del trabajo mediante Issues. Se puede acceder al repositorio público de este TFG mediante el siguiente [link](#).

#### 8. Visual Studio Code:

Visual Studio Code es un editor de código fuente potente y altamente personalizable desarrollado por Microsoft para los sistemas operativos Windows, Linux, macOS y plataformas web. Este editor es compatible con múltiples lenguajes de programación, posee herramientas de depuración integradas al igual que brinda acceso a una gran variedad de extensiones que permiten ampliar sus funcionalidades según las necesidades del usuario. Visual Studio se ha utilizado en este TFG como entorno para la edición y el desarrollo del código de la aplicación de Shiny [Microsoft, 2024].

## 9. Python:

Python es un lenguaje de programación de alto nivel, interpretado y multiparadigma, puesto que soporta la orientación a objetos, la programación imperativa y también la programación funcional. Este lenguaje de programación destaca por su sencillez sintáctica y su amplia versatilidad, lo que lo hace muy popular. Python contiene una amplia biblioteca estándar y pone a disposición del usuario una gran variedad de paquetes adicionales. Se ha utilizado en este TFG como lenguaje de programación para implementar el código de la aplicación de Shiny [[Python Software Foundation, 2024](#)].

Los paquetes adicionales mencionados previamente se encuentran disponibles de forma gratuita y pueden instalarse mediante el comando `pip install (nombre del paquete)` en el terminal. Para la desarrollo de la aplicación web, se han empleado los siguientes paquetes de Python:

- **Shiny:** es una biblioteca que sirve para construir aplicaciones web interactivas en R o Python sin la necesidad de un conocimiento previo en desarrollo web. Además de ofrecer herramientas para crear interfaces de usuario dinámicas y funciones de renderizado, es compatible con otras bibliotecas de visualización de datos populares, como Matplotlib, Seaborn [[Posit, 2024](#)].
- **Pandas:** es una biblioteca rápida, potente y flexible utilizada para el análisis y la manipulación de datos estructurados de código abierto. Proporciona herramientas para trabajar con estructuras de datos, como por ejemplo dataframes, y realizar operaciones de transformación, agrupamiento y filtrado [[Pandas, 2024](#)].
- **NumPy:** es una biblioteca fundamental para realizar cálculos numéricos en Python (matemáticos y científicos). Da soporte para arrays multidimensionales y proporciona funciones matemáticas optimizadas para cálculos científicos u operaciones vectorizadas. Su nombre, NumPy es la abreviatura de "Numerical Python" [[NumPy, 2024](#)].
- **Scipy:** es una biblioteca científica que facilita herramientas matemáticas, científicas y de índole ingenieril. Se basa en NumPy pero incluye otras herramientas como algoritmos y funciones para

optimización, de integración, de álgebra lineal, de estadísticas, etc. [SciPy, 2024]

- **Pingouin:** es una biblioteca estadística de código abierto basada en Numpy y Pandas. Ofrece gran cantidad de funciones estadísticas avanzadas como Anovas de medidas repetidas, Ancovas, regresiones lineales y logísticas, factor de Bayes, test Chi-cuadrados, etc. [Pingouin, 2024]
- **Matplotlib:** es una biblioteca que sirve para crear gráficos estáticos, animados e interactivos en Python. Proporciona una variedad de visualizaciones, como gráficos de líneas y dispersión o histogramas que pueden ser personalizables [Matplotlib, 2024].
- **Seaborn:** es una biblioteca de visualización de datos que se fundamenta en Matplotlib. Proporciona una sintaxis notablemente más simple para la creación de gráficos estadísticos informativos, como mapas de calor y diagramas de violín [Waskom, 2024].
- **Pathlib:** es una biblioteca de Python que ofrece una interfaz orientada a objetos para manipular rutas de archivos y directorios de manera eficiente en cualquier sistema operativo [Pathlib, 2024].
- **Io:** es una biblioteca de Python que sirve para manejar diferentes tipos de de entrada y salida, como lectura y/o escritura de objetos stream o manipulación de datos en memoria [Io, 2024].
- **Base64:** es una biblioteca de Python utilizada para codificar y decodificar datos para las codificaciones determinadas en RFC 4648 para algoritmos Base64. Brinda funciones para la codificación de datos binarios a caracteres ASCII imprimibles y la decodificación de dichas codificaciones a datos binarios [Base64, 2024].



---

# Resultados

---

## 5.1. Resumen de resultados

Tras haber determinado experimentalmente los niveles de proteínas plasmáticas, los carbonilos totales en el plasma, la capacidad antioxidante total, los niveles de peroxidación lipídica y los niveles de glutatión reducido y oxidado antes y después de la intervención, en el grupo de control y en el grupo probiótico, con el fin de evaluar el estado de estrés oxidativo en deportistas de Crossfit, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas.

## 5.2. Discusión

Para un correcto análisis estadístico, se utilizó inicialmente el software Statgraphics 19. En primer lugar, se dispusieron precisamente los datos en las tablas del software, eliminando las muestras que, una vez conocida su condición, fueron descartadas para el análisis estadístico (muestras de sujetos que no completaron el ensayo de manera correcta, interrumpieron el entrenamiento o no tomaron la suplementación). Seguidamente se analizó la normalidad de los resultados con el test de Shapiro-Wilk [Shapiro and Wilk, 1965], ya que el tamaño de muestras es de 24 sujetos, y la homocedasticidad de varianzas con el test de Levene [Carroll and Schneider, 1985]. Una vez comprobadas estas condiciones sobre las muestras, se efectuó el análisis mediante un ANOVA factorial de medidas repetidas. Este método fue el más indicado ya que al tratarse de medidas repetidas en el tiempo, nos permite tener en cuenta el efecto intrasujetos además del efecto de la suplementación.

Adicionalmente, con el objetivo de proporcionar un enfoque informático a este TFG, que tiene un enfoque notablemente más biológico, y facilitar

la replicabilidad de los análisis estadísticos efectuados, se ha desarrollado una aplicación web interactiva utilizando la biblioteca Shiny [Posit, 2024] de Python [Python Software Foundation, 2024].

Lo que se ha buscado es el desarrollo de una aplicación web sencilla que permita realizar análisis estadísticos de forma automatizada y visual simplemente introduciendo los archivos Excel de los ensayos (Figura: 5.1). Esta herramienta ofrece una interfaz interactiva e intuitiva que es accesible para usuarios sin conocimientos estadísticos avanzados.

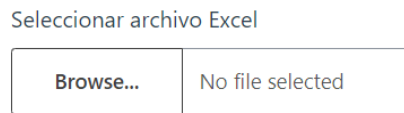


Figura 5.1: Selección de archivo Excel. Fuente propia con aplicación.

La aplicación procesa archivos Excel con los datos experimentales ya filtrados para su análisis estadístico (con la misma disposición que se introduce en Statgraphics, dos columnas con los resultados obtenidos pre y post tratamiento, dos columnas con los identificadores, una columna con el tipo de tratamiento y una columna con la diferencia entre resultados)(Figura: 5.1) y devuelve automáticamente estadísticas descriptivas, realiza el ANOVA de medidas repetidas, realiza pruebas t pareadas y ofrece diversas visualizaciones interactivas de los resultados. Esta herramienta no solo sirve para automatizar el proceso de análisis estadístico, sino que también ofrece una plataforma informática para futuros estudios con características similares, garantizando la reproducibilidad y consistencia en el análisis de datos.

### 5.3. Análisis de la normalidad de los datos

Antes de realizar el análisis de varianza (ANOVA) de todos los ensayos, es fundamental estudiar la normalidad de las muestras. Se ha realizado este análisis mediante el test de Shapiro-Wilk ya que es especialmente apropiado para muestras pequeñas ( $n < 50$ , y en nuestro caso,  $n = 24$ ) y se considera uno de los métodos más potentes para la verificación de normalidad (Tabla 5.1):

Ensayo	Estadístico W	Valor-P	Normalidad
Bradford	0.94654	0.2477	Sí
Nanodrop	0.96943	0.675279	Sí
Carbonilos	0.96178	0.500243	Sí
MDA	0.94750	0.259455	Sí
FRAP	0.93547	0.129229	Sí
GSH	0.94805	0.266407	Sí
GSSG	0.95001	0.292742	Sí

Tabla 5.1: Pruebas de Normalidad Shapiro-Wilk. Fuente propia.

Se ha analizado la normalidad de las distribuciones de todos los ensayos realizados (Bradford, Nanodrop, Carbonilos, MDA, FRAP, GSH y GSSG). Este análisis tiene un nivel de confianza del 95 %, donde:

- Hipótesis nula ( $H_0$ ): las muestras provienen de una distribución normal.
- Hipótesis alternativa ( $H_1$ ): las muestras no provienen de una distribución normal.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido para todos los ensayos es mayor o igual a 0.05 (oscilan entre 0,129229 y 0,675279), no se puede rechazar la hipótesis nula de que las muestras provengan de una distribución normal ( $H_0$ ).

Además, el estadístico W del test de Shapiro-Wilk es una medida que indica como de bien se ajustan las muestras a una distribución normal. El valor de W siempre se encuentra entre 0 y 1, esto significa que cuanto más se acerque el valor a 1, más probable es que los datos sigan una distribución normal. Sin embargo, cuanto más se aleje el valor de 1 (valor más cercano a 0) nos indica una mayor desviación de la normalidad [Shapiro and Wilk, 1965]. Para este estudio, se puede observar que las muestras de todos los ensayos siguen una muy buena distribución normal ya que los valores del estadístico W se aproximan todos a 1, siendo el valor mas bajo 0.93547.

## 5.4. Análisis de la homocedasticidad de varianzas

En segundo lugar y antes de realizar el ANOVA de todos los ensayos, es también fundamental estudiar la homocedasticidad de varianzas. Se ha

realizado este análisis mediante el test de Levene, una prueba estadística robusta que evalúa la igualdad de varianzas entre grupos (Tabla 5.2):

Ensayo	Levene's	Valor-P	Homocedasticidad
Bradford	2.67187	0.1170	Sí
Nanodrop	0.76787	0.3908	Sí
Carbonilos	0.41991	0.5240	Sí
MDA	0.75367	0.3951	Sí
FRAP	0.99284	0.3299	Sí
GSH	0.02103	0.8861	Sí
GSSG	0.01224	0.9129	Sí

Tabla 5.2: Test de Levene para la homocedasticidad de varianzas. Fuente propia

Se ha analizado la homocedasticidad de varianzas de las muestras de todos los ensayos realizados (Bradford, Nanodrop, Carbonilos, MDA, FRAP, GSH y GSSG). Este análisis tiene un nivel de confianza del 95 %, donde:

- Hipótesis nula ( $H_0$ ): las muestras tienen igualdad de varianzas.
- Hipótesis alternativa ( $H_1$ ): las muestras tienen diferencias significativas entre las mismas.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido para todos los ensayos es mayor o igual a 0.05 (oscilan entre 0,1170 y 0,9129), no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, confirmando la homocedasticidad de varianzas.

La verificación de la homocedasticidad de varianzas es de vital importancia ya que nos indica si las muestras presentan una variabilidad interna comparable para su posterior comparación en el ANOVA o si presentan una variabilidad interna muy grande (no comparable).

## 5.5. Análisis estadístico mediante ANOVA factorial de medidas repetidas

Por último y una vez verificadas la normalidad muestral y la homocedasticidad de varianzas, se lleva a cabo el ANOVA factorial de medidas repetidas (Tabla 5.3):



Ensayo	Fuente	SC	gl	CM	F	p-valor
Bradford	Modelo	15.3985	24	0.641605	0.71	0.7941
	Residuo	19.0471	21	0.907006		
	Total	34.4457	45			
Nanodrop	Modelo	42.1256	24	1.75523	1.58	0.1473
	Residuo	23.3588	21	1.11233		
	Total	65.4845	45			
Carbonilos	Modelo	7496.91	24	312.371	1.53	0.1639
	Residuo	4285.61	21	204.077		
	Total	11782.5	45			
MDA	Modelo	3.92407	24	0.163503	1.99	0.0573
	Residuo	1.72215	21	0.082007		
	Total	5.64621	45			
FRAP	Modelo	2365.64	25	94.6254	1.71	0.1044
	Residuo	1219.39	22	55.4269		
	Total	3585.03	47			
GSH	Modelo	7069.18	24	294.549	1.18	0.3536
	Residuo	5245.05	21	249.764		
	Total	12314.2	45			
GSSH	Modelo	1256.0	24	52.3334	1.62	0.1334
	Residuo	677.784	21	32.2754		
	Total	1933.79	45			

Tabla 5.3: Análisis de Varianza (ANOVA) Factorial de Medidas Repetidas

## Interpretación de índices estadísticos

En el ANOVA factorial de medidas repetidas, los diferentes índices estadísticos proporcionan distinta información sobre la variabilidad y significación de los resultados. A continuación, se detalla la interpretación de los principales componentes estudiados:

### Estadístico F y p-valor

El estadístico F compara la variabilidad entre grupos con la variabilidad dentro de los grupos, y cuanto mayor sea, nos indica una mayor probabilidad de diferencias significativas entre los grupos en estudio. El p-valor se considera estadísticamente significativo cuando es inferior o igual a 0,05 ya que rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias.

### Sumas de Cuadrados (SC)

En las sumas de cuadrados encontramos estos tres componentes principales:

- **SC modelo:** cuantifica la variabilidad explicada por los factores experimentales del estudio.
- **SC residual:** representa la variabilidad no explicada por el modelo, que se conoce mas comúnmente como error.
- **SC total:** es la suma de SC modelo y SC residual, que nos indica la variabilidad total en los datos.

### Grados de libertad (gl)

Los grados de libertad nos indican el número de valores independientes que pueden variar en el análisis:

- **gl modelo:** indica el número de parámetros independientes en el modelo estadístico.
- **gl residual:** representa la diferencia entre el número de observaciones independientes y los parámetros del modelo.
- **gl total:** es la suma de los grados de libertad del modelo y los grados de libertad residuales.

### Cuadrado Medio (CM)

El cuadrado medio representa la suma de cuadrados entre sus correspondientes grados de libertad:

- **CM modelo:** representa la varianza explicada por unidad de libertad.
- **CM residual:** indica la varianza no explicada por unidad de libertad.

A continuación se va a detallar brevemente los resultados obtenidos con el ANOVA para cada ensayo realizado en este TFG:

### Ensayo Bradford

El análisis muestra un valor  $F = 0.71$  con un  $p\text{-valor} = 0.7941$ , una suma de cuadrados del modelo de 15.3985 ( $gl = 24$ ,  $CM = 0.641605$ ), una suma de cuadrados residual de 19.0471 ( $gl = 21$ ,  $CM = 0.907006$ ) y una suma de cuadrados total de 34.4457 ( $gl = 45$ ). Como el  $p\text{-valor}$  obtenido (0.7941) no es menor que 0.05, podemos afirmar que no se observan diferencias significativas en la respuesta media entre la suplementación con probióticos y el grupo de control con un nivel de significancia del 5 %.

### Nanodrop

El análisis muestra un valor  $F = 1.58$  con un  $p\text{-valor} = 0.1473$ , una suma de cuadrados del modelo de 42.1256 ( $gl = 24$ ,  $CM = 1.75523$ ), una suma de cuadrados residual de 23.3588 ( $gl = 21$ ,  $CM = 1.11233$ ) y una suma de cuadrados total de 65.4845 ( $gl = 45$ ). Como el  $p\text{-valor}$  obtenido (0.1473) no es menor que 0.05, podemos afirmar que no se observan diferencias significativas en la respuesta media entre la suplementación con probióticos y el grupo de control con un nivel de significancia del 5 %.

### Carbonilos

El análisis muestra un valor  $F = 1.53$  con un  $p\text{-valor} = 0.1639$ , una suma de cuadrados del modelo de 7496.91 ( $gl = 24$ ,  $CM = 312.371$ ), una suma de cuadrados residual de 4285.61 ( $gl = 21$ ,  $CM = 204.077$ ) y una suma de cuadrados total de 11782.5 ( $gl = 45$ ). Como el  $p\text{-valor}$  obtenido (0.1639) no es menor que 0.05, podemos afirmar que no se observan diferencias significativas en la respuesta media entre la suplementación con probióticos y el grupo de control con un nivel de significancia del 5 %.

### MDA (Malondialdehído)

El análisis muestra un valor  $F = 1.99$  con un  $p\text{-valor} = 0.0573$ , una suma de cuadrados del modelo de 3.92407 ( $gl = 24$ ,  $CM = 0.163503$ ), una suma de cuadrados residual de 1.72215 ( $gl = 21$ ,  $CM = 0.082007$ ) y una suma de cuadrados total de 5.64621 ( $gl = 45$ ). Como el  $p\text{-valor}$  obtenido (0.0573) no es menor que 0.05, podemos afirmar que no se observan diferencias significativas en la respuesta media entre la suplementación con probióticos y el grupo de control con un nivel de significancia del 5 %.

## FRAP

El análisis muestra un valor  $F = 1.71$  con un  $p$ -valor  $= 0.1044$ , una suma de cuadrados del modelo de 2365.64 ( $gl = 25$ ,  $CM = 94.6254$ ), una suma de cuadrados residual de 1219.39 ( $gl = 22$ ,  $CM = 55.4269$ ) y una suma de cuadrados total de 3585.03 ( $gl = 47$ ). Como el  $p$ -valor obtenido (0.1044) no es menor que 0.05, podemos afirmar que no se observan diferencias significativas en la respuesta media entre la suplementación con probióticos y el grupo de control con un nivel de significancia del 5 %.

## GSH (Glutación reducido)

El análisis muestra un valor  $F = 1.18$  con un  $p$ -valor  $= 0.3536$ , una suma de cuadrados del modelo de 7069.18 ( $gl = 24$ ,  $CM = 294.549$ ), una suma de cuadrados residual de 5245.05 ( $gl = 21$ ,  $CM = 249.761$ ) y una suma de cuadrados total de 12314.2 ( $gl = 45$ ). Como el  $p$ -valor obtenido (0.3536) no es menor que 0.05, podemos afirmar que no se observan diferencias significativas en la respuesta media entre la suplementación con probióticos y el grupo de control con un nivel de significancia del 5 %.

## GSSH (Glutación oxidado)

El análisis muestra un valor  $F = 1.62$  con un  $p$ -valor  $= 0.1334$ , una suma de cuadrados del modelo de 1256.0 ( $gl = 24$ ,  $CM = 52.3334$ ), una suma de cuadrados residual de 677.784 ( $gl = 21$ ,  $CM = 32.2754$ ) y una suma de cuadrados total de 1933.79 ( $gl = 45$ ). Como el  $p$ -valor obtenido (0.1334) no es menor que 0.05, podemos afirmar que no se observan diferencias significativas en la respuesta media entre la suplementación con probióticos y el grupo de control con un nivel de significancia del 5 %.

## Conclusiones del análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el ANOVA factorial de medidas repetidas concluyen que ninguno de los ensayos realizados (Bradford, Nanodrop, Carbonilos, MDA, FRAP, GSH y GSSH) presenta diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental suplementado con probióticos y el grupo control suplementado con placebo ( $p > 0.05$  en todos los ensayos).

## 5.6. Análisis estadístico mediante la aplicación web

Como se ha comentado anteriormente, se ha desarrollado una herramienta que proporciona el análisis estadístico de las muestras y que ofrece diferentes visualizaciones para cada una de ellas, ofreciéndonos una exploración más interactiva y dinámica de los resultados. A continuación, se describen los distintos apartados que nos otorga la aplicación de Shiny:

### Estadísticas descriptivas

La herramienta nos ofrece una tabla de estadística descriptiva (Figura: 5.2), a partir de los archivos Excel previamente filtrados, que incluye:

Estadística Descriptiva

		count	mean	std	min	25%	50%	75%	max
Tratamiento	Tiempo								
PLACEBO	Post	10.000	104.304	20.439	73.606	91.215	106.451	111.853	147.233
	Pre	10.000	98.316	16.675	74.430	87.934	95.855	108.582	130.903
PROBIOTICO	Post	13.000	101.821	13.051	77.449	93.384	101.395	107.191	125.381
	Pre	13.000	95.993	15.840	72.753	88.067	93.689	110.660	117.950

Figura 5.2: Ejemplo de estadística descriptiva de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.

- **Count:** el número de muestras
- **Mean:** la media
- **Std:** la desviación estándar
- **Min:** los valores mínimos
- **Max:** los valores máximos
- **25 %, 50 %, 75 %:** los percentiles

Todos estos valores se calculan para cada combinación de tratamiento (probiótico o placebo) y de tiempo (pre y post tratamiento).

## ANOVA de medidas repetidas

La aplicación nos ofrece una tabla de los resultados del ANOVA de Medidas Repetidas 5.3), a partir de los archivos Excel previamente filtrados, y que evalúa tres efectos principales:

Resultados del ANOVA de Medidas Repetidas

	Fuente	Suma de Cuadrados	GL1	GL2	Cuadrado Medio	F-razón	P-valor
0	Tratamiento	65.2736	1.0000	21.0000	65.2736	0.1949	0.6633
1	Tiempo	400.0265	1.0000	21.0000	400.0265	1.9602	0.1761
2	Interaction	0.0724	1.0000	21.0000	0.0724	0.0004	0.9852

Figura 5.3: Ejemplo de ANOVA de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.

- **Efecto del tratamiento:** muestra las diferencias entre los grupos probiótico y placebo.
- **Efecto del tiempo:** muestra las diferencias entre las medidas pre y post tratamiento.
- **Efecto de la interacción:** muestra si el efecto del tiempo difiere entre los grupos de tratamiento.

Para cada uno de estos efectos, se ofrecen los siguientes parámetros estadísticos:

- **Suma de cuadrados (SC):** indica la variabilidad total de las muestras.
- **Grados de libertad (GL1 y GL2):** indican el número de valores independientes en el análisis estadístico. GL1 corresponde al efecto principal y GL2 al error.
- **Cuadrado medio (CM):** es una medida de varianza que se obtiene dividiendo la suma de cuadrados entre sus grados de libertad correspondientes.
- **F-razón:** indica el valor de la diferencia entre grupos en relación con la variabilidad dentro de los grupos.

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE LA APLICACIÓN WEB 49

- **P-valor:** indica la posibilidad de rechazar o aceptar la hipótesis nula en función de su valor. Un p-valor inferior o igual a 0.05 se considera estadísticamente significativo.

### Pruebas T pareadas

La web nos ofrece una tabla de los resultados de las pruebas T pareadas (5.3), a partir de los archivos Excel previamente filtrados, que nos proporcionan lo siguiente:

Prueba T Pareada

	Estadístico-T	P-valor	D de Cohen
PROBIOTICO	-1.1507	0.2723	-0.4016
PLACEBO	-0.8405	0.4224	-0.3211

Figura 5.4: Ejemplo de pruebas T pareadas de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.

- **Estadístico-T:** indica la diferencia entre las medias de las muestras pareadas. Un valor positivo significa un aumento y uno negativo una disminución entre las medidas pre y post tratamiento.
- **P-valor:** indica la posibilidad de rechazar o aceptar la hipótesis nula en función de su valor. Un p-valor inferior o igual a 0.05 se considera estadísticamente significativo.
- **D de Cohen:** cuantifica el tamaño del efecto, indicando la magnitud de la diferencia entre medidas pre y post tratamiento ( $d = 0.2$  indica un efecto pequeño,  $d = 0.5$  indica un efecto medio y  $d = 0.8$  indica un efecto grande).

### Visualizaciones interactivas

Tras mostrarnos las tres tablas de los diferentes análisis estadísticos, la aplicación nos ofrece cinco tipos diferentes de visualizaciones (el usuario debe seleccionar la que prefiera visionar) para explorar los datos (Figura: 5.5):

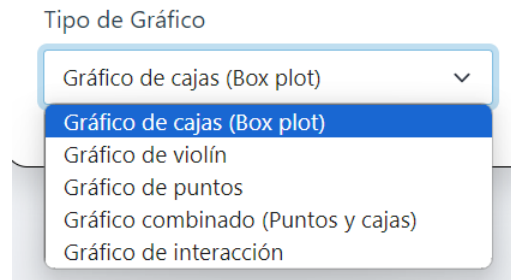


Figura 5.5: Desplegable con los distintos gráficos. Fuente propia con aplicación.

1. **Gráfico de cajas (Box plot):** este gráfico muestra la distribución de los datos, incluyendo la mediana, los cuartiles y los valores atípicos para cada grupo y tiempo (pre-post tratamiento) (Figura: 5.6).

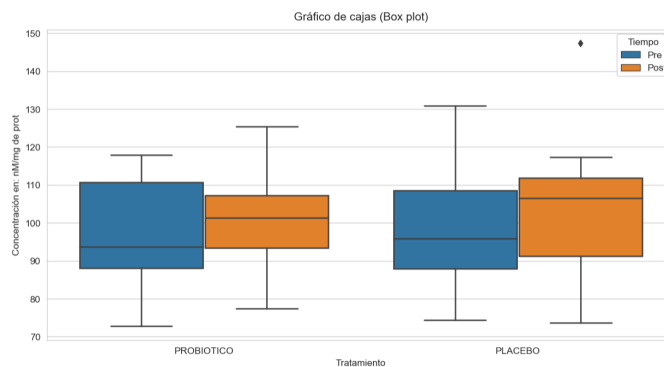


Figura 5.6: Ejemplo de un gráfico de cajas de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.

2. **Gráfico de violín:** este gráfico combina un diagrama de cajas con la densidad de probabilidad de las muestras, lo que proporciona una visualización más completa de la distribución (Figura: 5.7).
3. **Gráfico de puntos:** este gráfico muestra los valores individuales de cada muestra, lo que permite observar la dispersión real de los datos (Figura: 5.7).



## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE LA APLICACIÓN WEB 51

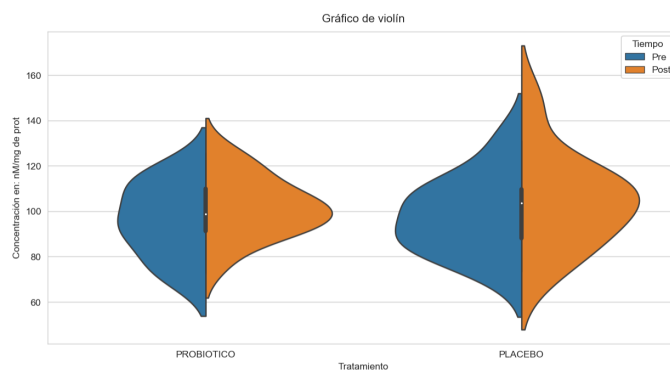


Figura 5.7: Ejemplo de un gráfico de violín de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.

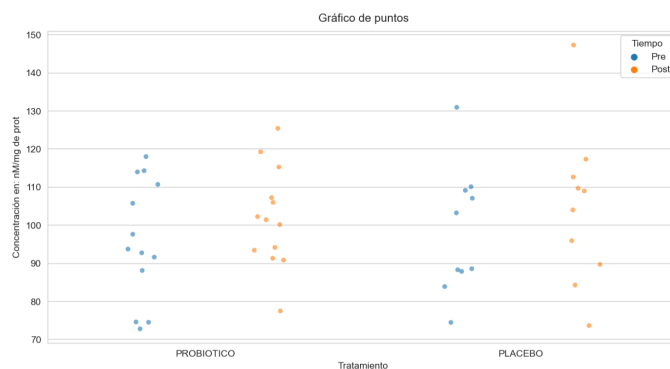


Figura 5.8: Ejemplo de un gráfico de puntos de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.

4. **Gráfico combinado (Puntos y cajas):** este gráfico superpone los valores individuales sobre un diagrama de cajas, lo que permite observar la distribución con los datos específicos (Figura: 5.9).
5. **Gráfico de interacción:** este gráfico representa las medias de cada grupo a lo largo del tiempo, con intervalos de confianza del 95 %, lo que permite visualizar posibles interacciones entre el tratamiento y el tiempo (pre-post tratamiento)(Figura: 5.10).

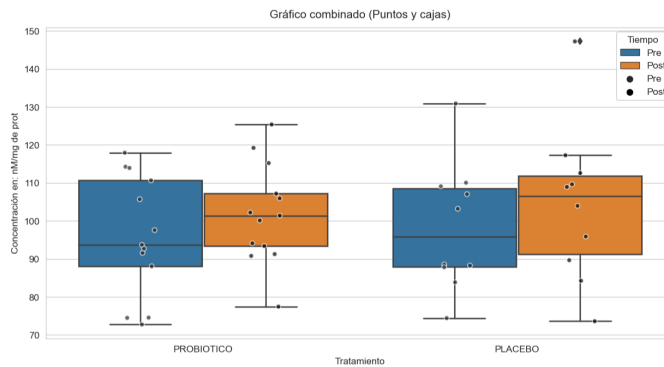


Figura 5.9: Ejemplo de un gráfico combinado de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.

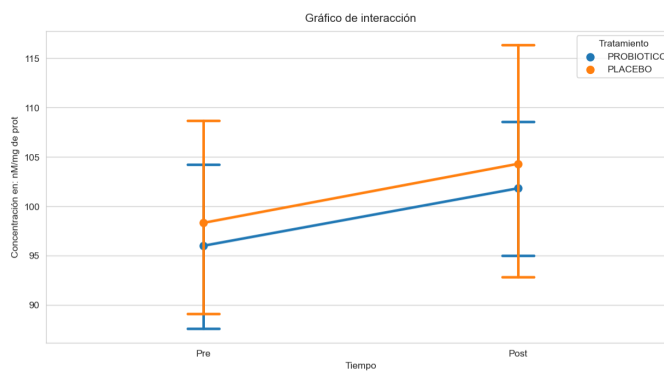


Figura 5.10: Ejemplo de un gráfico de interacción de Carbonilos. Fuente propia con aplicación.

Cabe remarcar que todos los gráficos contienen automáticamente las unidades de concentración específicas para cada ensayo y permiten una comparación visual directa entre los grupos de tratamiento y los tiempos de medición (pre-post tratamiento).

## Análisis de los resultados a través de la aplicación web Bradford

A continuación, se resumen los resultados estadísticos del ensayo Bradford, a los que se ha llegado gracias a la herramienta web creada (Tabla: 5.4):

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE LA APLICACIÓN WEB 53

Análisis	Parámetro	Resultado
Estadística Descriptiva	Probiótico Pre	Media = 7.474
		Desviación estándar = 0.994
	Probiótico Post	Media = 7.114
		Desviación estándar = 0.899
	Placebo Pre	Media = 7.225
		Desviación estándar = 0.911
ANOVA Medidas Repetidas	Placebo Post	Media = 7.478
		Desviación estándar = 0.685
	Efecto Tratamiento	F = 0.0558, p-valor = 0.8156 (no significativo)
	Efecto Tiempo	F = 0.1109, p-valor = 0.7424 (no significativo)
	Efecto Interacción	F = 1.1715, p-valor = 0.2914 (no significativo)
	Varianza Total	F = 0.0476, p-valor = 0.8283
Pruebas T pareadas	Probiótico	t = 0.8431, p-valor = 0.4157 d = 0.3801
	Placebo	t = -0.7736, p-valor = 0.4590 d = -0.3139

Tabla 5.4: Resumen de resultados estadísticos del ensayo Bradford. Fuente propia

La tabla con resultados estadísticos resumidos del ensayo Bradford muestra lo siguiente:

- Se observa que las medias y desviaciones estándar fueron similares en todos los grupos. El grupo probiótico muestra una ligera disminución en la media de 7.474 a 7.114 pero manteniendo una variabilidad similar (desviaciones estándar de 0.994 y 0.899 respectivamente). El grupo

placebo muestra un ligero aumento en la media de 7.225 a 7.478 pero sufre una reducción en la variabilidad (desviaciones estándar de 0.911 a 0.685).

- El ANOVA de medidas repetidas no muestra efectos significativos en ninguno de los análisis, ya que todos los p-valores son superiores a 0.05 (p-valor = 0.8156 para el tratamiento, p-valor = 0.7424 para el tiempo y p-valor = 0.2914 para el tratamiento y el tiempo).
- Por último, las pruebas T pareadas indican que las medias no sufren tendencias estadísticamente significativas ya que todos los p-valores son superiores a 0.05. El grupo probiótico muestra una tendencia positiva no significativa (p-valor = 0.4157) con un tamaño del efecto pequeño-medio ( $d = 0.3801$ ). El grupo placebo muestra una tendencia negativa no significativa (p-valor = 0.4590) con un tamaño del efecto pequeño-medio ( $d = -0.3139$ ).

## Nanodrop

A continuación, se resumen los resultados estadísticos del ensayo Nanodrop, a los que se ha llegado gracias a la herramienta web creada (Tabla: 5.5):

La tabla con resultados estadísticos del ensayo Nanodrop muestra lo siguiente:

- Se observa que las medias y desviaciones estándar fueron similares en todos los grupos. El grupo probiótico muestra una ligera disminución en la media de 8.718 a 8.092 y un aumento en la variabilidad (desviaciones estándar de 1.092 y 1.599 respectivamente). El grupo placebo muestra una disminución en la media de 8.854 a 8.172 pero mantiene una variabilidad similar (desviaciones estándar de 0.955 a 0.898).
- El ANOVA de medidas repetidas muestra efectos significativos solo en el tiempo (pre y post tratamiento), ya que su p-valor es inferior a 0.05 (p-valor = 0.7867 para el tratamiento, p-valor = 0.0488 para el tiempo y p-valor = 0.9299 para el tratamiento y el tiempo).

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE LA APLICACIÓN WEB 55

Análisis	Parámetro	Resultado
Estadística Descriptiva	Probiótico Pre	Media = 8.718
		Desviación estándar = 1.092
	Probiótico Post	Media = 8.092
		Desviación estándar = 1.599
	Placebo Pre	Media = 8.854
		Desviación estándar = 0.955
ANOVA Medidas Repetidas	Placebo Post	Media = 8.172
		Desviación estándar = 0.898
	Efecto Tratamiento	F = 0.0751, p-valor = 0.7867 (no significativo)
	Efecto Tiempo	F = 4.3739, p-valor = 0.0488 (significativo)
	Efecto Interacción	F = 0.0079, p-valor = 0.9299 (no significativo)
	Varianza Total	F = 0.0922, p-valor = 0.7629
Pruebas T pareadas	Probiótico	t = 1.3246, p-valor = 0.2100 d = 0.4573
	Placebo	t = 1.8787, p-valor = 0.0930 d = 0.7355

Tabla 5.5: Resumen de resultados estadísticos resumidos del ensayo Nanodrop.  
Fuente propia

- Por último, las pruebas T pareadas indican que las medias no sufren tendencias estadísticamente significativas ya que todos los p-valores son superiores a 0.05. El grupo probiótico muestra una tendencia positiva no significativa (p-valor = 0.2100) con un tamaño del efecto medio (d = 0.4573). El grupo placebo muestra una tendencia positiva no significativa pero cercana a la significación (p-valor = 0.0930) con un tamaño del efecto grande (d = 0.7355).

### Carbonilos

A continuación, se resumen los resultados estadísticos del ensayo Carbonilos, a los que se ha llegado gracias a la herramienta web creada (Tabla: 5.6):

Análisis	Parámetro	Resultado
Estadística Descriptiva	Probiótico Pre	Media = 95.993
		Desviación estándar = 15.840
	Probiótico Post	Media = 101.821
		Desviación estándar = 13.051
	Placebo Pre	Media = 98.316
		Desviación estándar = 16.675
	Placebo Post	Media = 104.304
		Desviación estándar = 20.439
ANOVA Medidas Repetidas	Efecto Tratamiento	F = 0.1949, p-valor = 0.6633 (no significativo)
	Efecto Tiempo	F = 1.9602, p-valor = 0.1761 (no significativo)
	Efecto Interacción	F = 0.0004, p-valor = 0.9852 (no significativo)
	Varianza Total	F = 0.2422, p-valor = 0.6252
Pruebas T pareadas	Probiótico	t = -1.1507, p-valor = 0.2723 d = -0.4016
	Placebo	t = -0.8405, p-valor = 0.4224 d = -0.3211

Tabla 5.6: Resumen de resultados estadísticos del ensayo Carbonilos. Fuente propia

La tabla con resultados estadísticos del ensayo Carbonilos muestra lo siguiente:

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE LA APLICACIÓN WEB 57

- Se observa que las medias y desviaciones estándar fueron similares en todos los grupos. El grupo probiótico muestra un ligero aumento en la media de 95.993 a 101.821 y una reducción en la variabilidad (desviaciones estándar de 15.840 y 13.051 respectivamente). El grupo placebo muestra un ligero aumento en la media de 98.316 a 104.304 y un aumento en la variabilidad (desviaciones estándar de 16.675 a 20.439).
- El ANOVA de medidas repetidas no muestra efectos significativos en ninguno de los análisis, ya que todos los p-valores son superiores a 0.05 (p-valor = 0.6633 para el tratamiento, p-valor = 0.1761 para el tiempo y p-valor = 0.9852 para el tratamiento y el tiempo).
- Por último, las pruebas T pareadas indican que las medias no sufren tendencias estadísticamente significativas ya que todos los p-valores son superiores a 0.05. El grupo probiótico muestra una tendencia negativa no significativa (p-valor = 0.2723) con un tamaño del efecto medio ( $d = -0.4016$ ). El grupo placebo muestra una tendencia negativa no significativa (p-valor = 0.4224) con un tamaño del efecto medio ( $d = -0.3211$ ).

### MDA

A continuación, se resumen los resultados estadísticos del ensayo MDA, a los que se ha llegado gracias a la herramienta web creada (Tabla: 5.7):

La tabla con resultados estadísticos del ensayo MDA muestra lo siguiente:

- Se observa que las medias y desviaciones estándar fueron similares en todos los grupos. El grupo probiótico muestra un ligero aumento en la media de 0.894 a 0.935 y un notable aumento en la variabilidad (desviaciones estándar de 0.238 y 0.585 respectivamente). El grupo placebo muestra una disminución en la media de 0.935 a 0.692 y una reducción en la variabilidad (desviaciones estándar de 0.203 a 0.084).
- El ANOVA de medidas repetidas no muestra efectos significativos en ninguno de los análisis, ya que todos los p-valores son superiores a 0.05 (p-valor = 0.4159 para el tratamiento, p-valor = 0.3402 para el tiempo y p-valor = 0.1109 para el tratamiento y el tiempo).

<b>Análisis</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
Estadística Descriptiva	Probiótico Pre	Media = 0.894
		Desviación estándar = 0.238
	Probiótico Post	Media = 0.935
		Desviación estándar = 0.585
	Placebo Pre	Media = 0.935
		Desviación estándar = 0.203
ANOVA Medidas Repetidas	Placebo Post	Media = 0.692
		Desviación estándar = 0.084
	Efecto Tratamiento	F = 0.6890, p-valor = 0.4159 (no significativo)
	Efecto Tiempo	F = 0.9525, p-valor = 0.3402 (no significativo)
	Efecto Interacción	F = 2.7704, p-valor = 0.1109 (no significativo)
	Varianza Total	F = 0.9239, p-valor = 0.3420
Pruebas T pareadas	Probiótico	t = -0.2917, p-valor = 0.7755 d = -0.0914
	Placebo	t = 3.7177, p-valor = 0.0048 d = 1.5648

Tabla 5.7: Resumen de resultados estadísticos del ensayo MDA. Fuente propia

- Por último, las pruebas T pareadas indican que las medias sufren tendencias estadísticamente significativas en uno de los grupos. El grupo probiótico muestra una tendencia negativa no significativa (p-valor = 0.7755) con un tamaño del efecto muy pequeño (d = -0.0914). El grupo placebo muestra una tendencia positiva significativa (p-valor = 0.0048) con un tamaño del efecto muy grande (d = 1.5648).



**FRAP**

A continuación, se resumen los resultados estadísticos del ensayo FRAP, a los que se ha llegado gracias a la herramienta web creada (Tabla: 5.8):

Análisis	Parámetro	Resultado
Estadística Descriptiva	Probiótico Pre	Media = 20.365
		Desviación estándar = 7.296
	Probiótico Post	Media = 14.766
		Desviación estándar = 8.727
	Placebo Pre	Media = 22.164
		Desviación estándar = 10.376
ANOVA Medidas Repetidas	Placebo Post	Media = 16.179
		Desviación estándar = 7.494
	Efecto Tratamiento	F = 0.3419, p-valor = 0.5647
		(no significativo)
	Efecto Tiempo	F = 7.1812, p-valor = 0.0137
		(significativo)
	Efecto Interacción	F = 0.0078, p-valor = 0.9303
		(no significativo)
	Varianza Total	F = 0.4196, p-valor = 0.5205
Pruebas T pareadas	Probiótico	t = 1.7696, p-valor = 0.1002
		d = 0.6960
	Placebo	t = 2.2854, p-valor = 0.0481
		d = 0.6612

Tabla 5.8: Resumen de resultados estadísticos del ensayo FRAP. Fuente propia

La tabla con resultados estadísticos del ensayo FRAP muestra lo siguiente:

- Se observa que las medias y desviaciones estándar fueron similares en todos los grupos. El grupo probiótico muestra una disminución en la media de 20.365 a 14.766 y un aumento en la variabilidad (desviaciones estándar de 7.296 y 8.727 respectivamente). El grupo placebo muestra una disminución en la media de 22.164 a 16.179 y una reducción en la variabilidad (desviaciones estándar de 10.376 a 7.494).
- El ANOVA de medidas repetidas muestra efectos significativos en el tiempo (pre y post tratamiento), ya que su p-valor es inferior a 0.05 (p-valor = 0.5647 para el tratamiento, p-valor = 0.0137 para el tiempo y p-valor = 0.9303 para el tratamiento y el tiempo).
- Por último, las pruebas T pareadas indican que las medias sufren tendencias estadísticamente significativas en uno de los grupos. El grupo probiótico muestra una tendencia positiva no significativa (p-valor = 0.1002) con un tamaño del efecto medio-grande ( $d = 0.6960$ ). El grupo placebo muestra una tendencia positiva significativa (p-valor = 0.0481) con un tamaño del efecto medio-grande ( $d = 0.6612$ ).

## GSH

A continuación, se resumen los resultados estadísticos del ensayo GSH, a los que se ha llegado gracias a la herramienta web creada (Tabla: 5.9):

La tabla con resultados estadísticos del ensayo GSH muestra lo siguiente:

- Se observa que las medias y desviaciones estándar fueron similares en todos los grupos. El grupo probiótico muestra una disminución en la media de 61.816 a 56.303 y una reducción en la variabilidad (desviaciones estándar de 18.780 y 13.077 respectivamente). El grupo placebo muestra una disminución en la media de 66.829 a 62.711 y mantiene una variabilidad similar (desviaciones estándar de 17.555 a 17.013).
- El ANOVA de medidas repetidas no muestra efectos significativos en ninguno de los análisis, ya que todos los p-valores son superiores a 0.05 (p-valor = 0.2845 para el tratamiento, p-valor = 0.3043 para el tiempo y p-valor = 0.8834 para el tratamiento y el tiempo).

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE LA APLICACIÓN WEB 61

Análisis	Parámetro	Resultado
Estadística Descriptiva	Probiótico Pre	Media = 61.816
		Desviación estándar = 18.780
	Probiótico Post	Media = 56.303
		Desviación estándar = 13.077
	Placebo Pre	Media = 66.829
		Desviación estándar = 17.555
ANOVA Medidas Repetidas	Placebo Post	Media = 62.711
		Desviación estándar = 17.013
	Efecto Tratamiento	F = 1.2062, p-valor = 0.2845 (no significativo)
	Efecto Tiempo	F = 1.1086, p-valor = 0.3043 (no significativo)
	Efecto Interacción	F = 0.0220, p-valor = 0.8834 (no significativo)
	Varianza Total	F = 1.3275, p-valor = 0.2558
Pruebas T pareadas	Probiótico	t = 0.9107, p-valor = 0.3804 d = 0.3407
	Placebo	t = 0.5656, p-valor = 0.5855 d = 0.2382

Tabla 5.9: Resumen de resultados estadísticos del ensayo GSH. Fuente propia

- Por último, las pruebas T pareadas indican que las medias no sufren tendencias estadísticamente significativas ya que todos los p-valores son superiores a 0.05. El grupo probiótico muestra una tendencia positiva no significativa (p-valor = 0.3804) con un tamaño del efecto pequeño-medio (d = 0.3407). El grupo placebo muestra una tendencia positiva no significativa (p-valor = 0.5855) con un tamaño del efecto pequeño (d = 0.2382).

## GSSG

A continuación, se resumen los resultados estadísticos del ensayo GSSG, a los que se ha llegado gracias a la herramienta web creada (Tabla: 5.10):

Análisis	Parámetro	Resultado
Estadística Descriptiva	Probiótico Pre	Media = 16.383
		Desviación estándar = 5.346
	Probiótico Post	Media = 17.735
		Desviación estándar = 7.678
	Placebo Pre	Media = 18.715
		Desviación estándar = 6.517
ANOVA Medidas Repetidas	Placebo Post	Media = 14.368
		Desviación estándar = 6.597
	Efecto Tratamiento	F = 0.0553, p-valor = 0.8164
		(no significativo)
	Efecto Tiempo	F = 0.4514, p-valor = 0.5090
		(no significativo)
Pruebas T pareadas	Efecto Interacción	F = 2.8441, p-valor = 0.1065
		(no significativo)
	Varianza Total	F = 0.0695, p-valor = 0.7933
	Probiótico	t = -0.6115, p-valor = 0.5523
		d = -0.2044
	Placebo	t = 1.6939, p-valor = 0.1245
		d = 0.6629

Tabla 5.10: Resumen de resultados estadísticos del ensayo GSSG. Fuente propia

La tabla con resultados estadísticos del ensayo GSSG muestra lo siguiente:

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE LA APLICACIÓN WEB 63

- Se observa que las medias y desviaciones estándar fueron similares en todos los grupos. El grupo probiótico muestra un ligero aumento en la media de 16.383 a 17.735 y un aumento en la variabilidad (desviaciones estándar de 5.346 y 7.678 respectivamente). El grupo placebo muestra una disminución en la media de 18.715 a 14.368 y mantiene una variabilidad similar (desviaciones estándar de 6.517 a 6.597).
- El ANOVA de medidas repetidas no muestra efectos significativos en ninguno de los análisis, ya que todos los p-valores son superiores a 0.05 (p-valor = 0.8164 para el tratamiento, p-valor = 0.5090 para el tiempo y p-valor = 0.1065 para el tratamiento y el tiempo).
- Por último, las pruebas T pareadas indican que las medias no sufren tendencias estadísticamente significativas ya que todos los p-valores son superiores a 0.05. El grupo probiótico muestra una tendencia negativa no significativa (p-valor = 0.5523) con un tamaño del efecto pequeño ( $d = -0.2044$ ). El grupo placebo muestra una tendencia positiva no significativa (p-valor = 0.1245) con un tamaño del efecto medio-grande ( $d = 0.6629$ ).



---

## Conclusiones

---

La conclusión general a la que se ha llegado con este estudio es que la suplementación con probióticos utilizada (*Lactobacillus plantarum* PS128  $1 \times 10^{10}$  UFC por cápsula de la marca Swandson) no tiene consecuencias significativas sobre el estrés oxidativo en deportistas de Crossfit. Esto es debido a que, a grandes rasgos, ninguno de los biomarcadores analizados ha mostrado una variación estadísticamente significativa tras la suplementación, pues no ha habido un cambio relevante en la concentración de proteínas plasmáticas, en los carbonilos totales en el plasma, en la peroxidación lipídica, en la capacidad antioxidante ni en los niveles de glutatión reducido y oxidado.

No obstante, el análisis estadístico más detallado realizado mediante la aplicación web desarrollada ha permitido identificar algunos hallazgos estadísticamente significativos. En el ensayo FRAP se observaron diferencias significativas en el efecto del tiempo pre y post tratamiento ( $p = 0.0137$ ) y el grupo placebo mostró una tendencia positiva significativa ( $p = 0.0481$ ) sobre la capacidad antioxidante total, lo que no apoya un efecto positivo de la suplementación con *Lactobacillus plantarum* PS128. Por otro lado, en el ensayo MDA, el grupo placebo mostró una tendencia positiva significativa ( $p = 0.0048$ ) de la cuantificación de peroxidación lipídica, con un tamaño del efecto muy grande ( $d = 1.5648$ ), lo que soportaría la hipótesis de partida del estudio en la que la suplementación con probióticos disminuiría este biomarcador de estrés oxidativo. Cabe destacar que en el ensayo Nanodrop, se observaron diferencias significativas en la cantidad de proteínas plasmáticas detectadas para el efecto del tiempo pre y post tratamiento ( $p = 0.0488$ ), aunque no sea un indicador que pueda desmentir o confirmar la hipótesis de partida del estudio.

Por tanto, estos hallazgos puntuales no modifican la conclusión general del estudio, ya que no demuestran un efecto consistente y sistemático de la suplementación con probióticos.

Por ello, es posible que, de haberse analizado cada muestra en los cuatro momentos previstos en el diseño inicial, las conclusiones hubieran sido diferentes, ya que un factor determinante en el nivel protector de la suplementación frente al estrés oxidativo en los deportistas podría ser, precisamente, el nivel de estrés generado tras la sesión de ejercicio intenso. Además, para poder desechar por completo el efecto de la suplementación, deberíamos considerar otros factores como el sexo, edad, o niveles de partida, es decir, en estado basal.

De hecho, si aún y con todo no se observaran diferencias estadísticamente significativas, no podríamos descartar los beneficios de la suplementación con probióticos en el estado redox de los deportistas sin explorar otras posibilidades, como modificar la duración de la intervención, la dosis de probiótico o incluso su composición (añadiendo otras cepas, por ejemplo). Análogamente, los antecedentes bibliográficos encontrados respaldan el efecto beneficioso de los probióticos en otro tipo de deportistas, mejorando la recuperación, la función inmune y el rendimiento, tal y como se ve en el estudio [Belda Borja, 2021] donde se estudiaron distintos atletas indistintamente de la disciplina o en una revisión sistemática más reciente del grupo [Fernandez-Lazaro et al., 2023] donde se ha estudiado que la suplementación probiótica puede ser de gran utilidad para regular la inflamación en adultos (físicamente activos) y en atletas.

Además, *Lactobacillus plantarum* es una buena opción, ya que se ha visto que la cepa *Lactobacillus plantarum* TWK10 [Huang et al., 2018] mejora la recuperación post-ejercicio y el rendimiento de resistencia.

Sin embargo, en cuanto a ensayos con deportistas de Crossfit, los estudios son muy limitados en comparación con los estudios de otro tipo de deportes. Así, cabe destacar un estudio reciente llevado a cabo en el grupo de investigación sobre la suplementación con *Tribulus terrestris* L. durante seis semanas sobre el rendimiento deportivo y aspectos relacionados con el mismo en atletas [Fernández-Lázaro et al., 2022] o el estudio de [Di Dio et al., 2023], donde se observa como la suplementación con probióticos de varias cepas podría mejorar la resistencia, la recuperación, la fuerza, el dolor muscular y la composición corporal de los atletas.

Por tanto, la falta de diferencias significativas observadas en este estudio puede atribuirse al tipo de disciplina deportiva, la composición y dosis del probiótico utilizado, u otros factores no controlados. Por lo que se



requiere mayor investigación para establecer el verdadero potencial de los probióticos en el contexto de los atletas de Crossfit. Esto facilitará una mayor suplementación deportiva más eficiente, con menores riesgos que podría ser útil para el diseño de otras intervenciones enfocadas en la prevención de distintas enfermedades en las que media el estrés oxidativo.

Por ende, es fundamental que se continúen los estudios que aporten evidencias firmes sobre el potencial de los probióticos como estrategia nutricional para modular el equilibrio redox y mejorar el desempeño de los atletas, lo que desembocará en un mayor conocimiento acerca de cómo están relacionados la actividad física y el estrés oxidativo y cómo mitigar el daño oxidativo debido al ejercicio intenso. Esto facilitará una mayor precisión en cuanto a suplementación deportiva y podría ser útil para el diseño de otras intervenciones enfocadas en la prevención de distintas enfermedades en las que media el estrés oxidativo.

## 6.1. Aspectos relevantes

Este Trabajo de Fin de grado está enfocado en la biología molecular, adicionando distintas técnicas informáticas para su correcto análisis como la bioestadística y la programación de una aplicación web. El enfoque de este trabajo me ha hecho ver como el grado de Ingeniería de la Salud tiene una gran utilidad para la combinación de conocimientos más biológicos (por ejemplo, en las técnicas de laboratorio) con otros más ingenieriles o informáticos (como el uso de softwares específicos o el desarrollo de herramientas más específicas).

La fase en la que se realizaron las técnicas de laboratorio fue la que presentó más dificultades debido a la complejidad de estas técnicas y el número tan elevado de muestras a analizar (92 muestras). Cabe destacar la técnica del malondialdehído, que tuve que repetir tres veces debido a la obtención nula de resultados en los dos primeros ensayos. Esto fue un proceso largo puesto que es una técnica que precisa de alrededor de 9 horas de laboratorio por su protocolo experimental. Por suerte, el resto de las técnicas se pudieron desarrollar de manera adecuada sin complicaciones reseñables.

La etapa de análisis de datos se desempeñó en el software Excel, ya que era más fácil incluir las medidas repetidas hechas en microplacas distintas que en el Gen 5.2, lo que me permitió ampliar considerablemente mi conocimiento sobre la utilización de dicho programa, manejando diversas funciones y herramientas del software, como fórmulas avanzadas, y gráficos, que fueron

esenciales para la organización y visualización los resultados obtenidos. Esta etapa no presentó complicaciones notables, pero sí que requirió de una previa documentación acerca de las unidades de cada técnica y de una organización meticulosa por el número considerablemente elevado de muestras.

Además, para el análisis estadístico mediante softwares específicos, me fueron imprescindibles los conocimientos adquiridos en la asignatura de bioestadística del grado, que me brindaron una sólida base teórica y práctica en cuanto a técnicas estadísticas se refiere, permitiéndome realizar pruebas de hipótesis y ANOVA para interpretar correctamente los resultados obtenidos. Para esta fase fue necesaria una correcta elección del método estadístico a utilizar, debido a las distintas pruebas disponibles.

Por último, la fase de desarrollo de la aplicación web utilizando con la biblioteca Shiny de Python, representó un desafío interesante ya que combiné los conocimientos de programación adquiridos a lo largo de la carrera con los de bioestadística. El desarrollo de esta herramienta demuestra cómo la combinación de habilidades técnicas y conocimientos biológicos puede ser de gran utilidad para la creación de herramientas prácticas que faciliten la investigación en el ámbito de la salud.

Concluyendo, este TFG me ha brindado la oportunidad de profundizar en el campo más experimental de la titulación, concretamente en el campo de la biología molecular, sin dejar de lado otros campos como la programación informática o el análisis de datos. Cabe remarcar también que esta investigación abre las puertas a nuevos estudios acerca del estrés oxidativo y los atletas, que pueden llevar a futuros hallazgos de importancia para la salud humana.

---

## Líneas de trabajo futuras

---

En este último apartado de la memoria, se presentarán de manera resumida diversas posibilidades para mejorar el proyecto, así como ideas para continuar con el desarrollo y la expansión del trabajo realizado.

### **Ampliación del ensayo**

En primer lugar, para obtener una versión mejorada de este proyecto sería importante ampliar las fronteras del mismo. Por ejemplo, se podría considerar un mayor número de sujetos a evaluar para lograr unos resultados estadísticamente más significantes. Se podría también diversificar la población, ampliando el rango de edad y no centrándose solo en deportistas de Crossfit, sino en multitud de disciplinas deportivas. Sería también interesante evaluar la presencia de discrepancias en los efectos de los probióticos dependiendo en las características individuales de cada sujeto mediante un análisis previo de la microbiota intestinal.

### **Evaluación de otros biomarcadores de estrés oxidativo**

A continuación, sería importante ampliar el número de biomarcadores de estrés oxidativo a estudiar, como por ejemplo, cuantificando el daño oxidativo en ácidos nucleicos. Sería igualmente útil llevar a cabo el estudio de la relación entre estos biomarcadores. para la obtención de un biomarcador único, o un índice, como por ejemplo, el ya conocido OXY-SCORE [Veglia et al., 2009].

El OXY-SCORE es un índice integral para la evaluación del estrés oxidativo, combinando biomarcadores de daño oxidativo y de defensa antioxidante. Incluye niveles plasmáticos de malondialdehído libre y total, glutatión oxidado y reducido y capacidad antioxidante entre otros. Este índice ha sido evaluado

mediante el ensayo con pacientes con enfermedad arterial coronaria en comparación con individuos sanos, demostrándose que los pacientes enfermos presentaban un OXY-SCORE notablemente mayor que los pacientes sanos. Otro estudio demostró que el OXY-SCORE puede diferenciar entre distintos niveles de estrés oxidativo causados por una cirugía de bypass coronario con y sin circulación extracorpórea. Este índice representa un claro ejemplo de cómo se puede obtener un indicador general, mediante la combinación de múltiples biomarcadores de estrés oxidativo, que refleje tanto la capacidad antioxidante como el daño oxidativo del organismo. La ampliación de esta investigación, incluyendo por ejemplo biomarcadores adicionales como el daño de ácidos nucleicos, podría servir para incrementar la precisión del ya existente OXY-SCORE o incluso podría llevar a la invención de un índice de estrés oxidativo centrado en deportistas, más preciso y robusto, que pudiera indicar cuando la oxidación es superior a la capacidad antioxidante para poder actuar.

### Desarrollo de protocolos de suplementación

La expansión del trabajo realizado podría continuarse con el desarrollo de protocolos de suplementación. Protocolos donde la duración de la suplementación, la dosis o frecuencia estén establecidas rigurosamente y donde se pueda también evaluar la combinación de probióticos con otros suplementos más comúnmente utilizados como por ejemplo las vitaminas o proteínas. En cuanto al desarrollo de protocolos de suplementación con dosis distintas a la utilizada para este TFG cabe destacar que el estudio del efecto de la administración oral diaria de *Lactobacillus plantarum* PS128 sobre la recuperación de la capacidad de ejercicio después de una media maratón [Fu et al., 2021], ha demostrado que la administración de *Lactobacillus plantarum* PS128 en dosis de  $3 \times 10^{10}$  UFC dos veces al día podría ser útil para reducir el daño muscular y el estrés oxidativo en corredores de media maratón. Estos descubrimientos podrían servir como punto de partida para establecer protocolos de suplementación más específicos para diferentes modalidades deportivas, ajustando las dosis y frecuencias según la intensidad y tipo de ejercicio.

También podrían utilizarse distintas cepas probióticas para poder analizar la eficacia de diferentes especies. De este modo, se podría estudiar el impacto de distintas combinaciones probióticas sobre el estrés oxidativo.

Otra opción para la expansión de los protocolos sería el desarrollo de protocolos de suplementación personalizados basados en el perfil genético y microbiota intestinal de cada individuo, con el fin de incrementar notablemente la eficacia de los probióticos y suplementos antioxidantes [Zmora et al., 2018].

### **Predicción de un biomarcador mediante inteligencia artificial**

Una línea futura con una amplia visión de futuro podría ser la predicción de un determinado biomarcador mediante inteligencia artificial en función de los otros biomarcadores. Para poder llevarse a cabo, se debería recolectar una gran cantidad de datos detallados de distintos biomarcadores de estrés oxidativo en distintas muestras y asegurando su calidad. Seguidamente, se procedería a la limpieza y normalización de los datos para una selección de las características más relevantes. A continuación, se diseñarían y entrenarían distintos modelos de redes neuronales, cualificando diferentes arquitecturas para encontrar la más afín al objetivo. Posteriormente, se llevaría a cabo la validación del modelo mediante técnicas de validación cruzada y conjuntos de prueba independientes. Por último, el modelo podría implementarse en sistemas de análisis de laboratorio, monitorizando y actualizando su rendimiento con nuevos datos para mantener la precisión y eficacia del modelo en la predicción. Esta predicción podría reducir notablemente el tiempo y el coste asociado a la medición de múltiples biomarcadores de estrés oxidativo.

### **Monitorización de biomarcadores determinados en sangre**

Otra posible línea futura sería la monitorización del nivel de algún biomarcador determinado en sangre, como por ejemplo el desarrollo de un sensor electroquímico de peróxido de hidrógeno, mediante un dispositivo electrónico. Para su implementación es necesario seguir distintos pasos conectados entre sí. En primer lugar, se debería seleccionar rigurosamente el biomarcador a monitorizar, basándose en su relevancia clínica y fisiológica. Seguidamente, habría que llevar a cabo el desarrollo de un sensor electrónico específico, biocompatible y de tamaño muy pequeño, que pudiera detectar de manera precisa y continua este biomarcador en sangre. En tercer lugar, se calibraría y validaría el sensor mediante una serie de pruebas estrictas, lo que garantizaría su precisión en distintas condiciones. Posteriormente, y una vez validado el sensor, se desarrollaría un sistema portátil que permitiera la monitorización en tiempo real para un correcto seguimiento del paciente, con una interfaz de usuario intuitiva para facilitar la visualización y el análisis de los datos obtenidos. Se podría también desarrollar un sistema de alertas en función de los niveles detectados en sangre. Por último, se deberían realizar ensayos clínicos validando la eficacia y la seguridad del dispositivo. Una tecnología de estas características podría proporcionar una vigilancia permanente de biomarcadores determinados, representando una gran innovación en el campo biomédico.

**Generalización y mejora de la aplicación web**

Una última línea de trabajo futura a destacar sería la generalización y optimización de la aplicación web desarrollada para el análisis estadístico. Esto podría llevarse a cabo permitiendo que la aplicación admita otros formatos de entrada de datos, no limitándose únicamente a archivos Excel con una estructura específica, sino permitiendo la importación de datos mas generales y con distintos formatos (CSV, bases de datos, etc.). Esto ampliaría su funcionalidad además de aumentar su versatilidad y aplicabilidad en otros contextos de investigación mas amplios. Además, se podría también desarrollar un sistema de análisis estadístico más completo, con nuevas pruebas estadísticas (comparación entre distintos biomarcadores, pruebas no paramétricas para datos que no sigan una distribución normal, o la implementación del índice OXY-SCORE mencionado anteriormente) y otros métodos de visualización más avanzados. Podría expandirse también incluyendo un módulo de machine learning, permitiendo por ejemplo la identificación de patrones y la predicción de resultados basados en datos históricos previamente almacenados. Otra mejora podría ser el desarrollo de una función dentro de la aplicación que permita generar informes automáticos personalizables en distintos formatos (Word, PDF, LaTeX, etc.), que incluyan tanto los resultados estadísticos como su posible interpretación automatizada.

---

## Bibliografía

---

- [Ayala et al., 2014] Ayala, A., Muñoz, M. F., and Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014(1):360438.
- [Base64, 2024] Base64 (2024). base64 — codificación de datos binarios en ascii. (Accessed on 10/19/2024).
- [Belda Borja, 2021] Belda Borja, V. (2021). Mejora del rendimiento deportivo en atletas que consumen probióticos. revisión bibliográfica sistemática.
- [Biomarkers Definitions Working Group et al., 2001] Biomarkers Definitions Working Group, Atkinson Jr, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Oates, J. A., Peck, C. C., Schooley, R. T., et al. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 69(3):89–95.
- [Bradford, 1976] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2):248–254.
- [Bueno, 2015] Bueno, D. M. (2015). Fibromialgia síntomas. (Accessed on 06/04/2024).
- [Byjus, 2020] Byjus (2020). 2,4 dnp test (2,4-dinitrophenylhydrazine)[c6h3(no2)2nhnh2] - brady's reagent, synthesis, structure with examples. (Accessed on 06/06/2024).

- [Carroll and Schneider, 1985] Carroll, R. J. and Schneider, H. (1985). A note on levene's tests for equality of variances. *Statistics & probability letters*, 3(4):191–194.
- [Carvajal, 2019] Carvajal, C. C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1):91–100.
- [Crowson and McClave, 2020] Crowson, M. M. and McClave, S. A. (2020). Does the intestinal microbiome impact athletic performance? *Current Gastroenterology Reports*, 22:1–7.
- [Dalle-Donne et al., 2006] Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Gius-tarini, D., and Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4):601–623.
- [Delgado Ovejero, 2020] Delgado Ovejero, M. (2020). Estudio de los efectos de la suplementación con probióticos sobre el sistema inmunitario en deportistas de alto rendimiento. revisión bibliográfica.
- [Di Dio et al., 2023] Di Dio, M., Calella, P., Pelullo, C. P., Liguori, F., Di Onofrio, V., Gallè, F., and Liguori, G. (2023). Effects of probiotic supplementation on sports performance and performance-related features in athletes: a systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3):2226.
- [Díaz-Jiménez et al., 2021] Díaz-Jiménez, J., Sánchez-Sánchez, E., Ordoñez, F. J., Rosety, I., Díaz, A. J., Rosety-Rodriguez, M., Rosety, M. Á., and Brenes, F. (2021). Impact of probiotics on the performance of endurance athletes: A systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21):11576.
- [Durán, 2023] Durán, M. (2023). Para qué sirve excel, principales características y cómo funciona. (Accessed on 06/07/2024).
- [Elejalde Guerra, 2001] Elejalde Guerra, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *Anales de medicina interna*, volume 18, pages 50–59. SciELO Espana.
- [Escorza and Salinas, 2009] Escorza, M. A. Q. and Salinas, J. V. C. (2009). La capacidad antioxidante total. bases y aplicaciones. *Revista de educación bioquímica*, 28(3):89–101.



- [Fagali, 2011] Fagali, N. S. (2011). *Peroxidación de diferentes especies lipídicas: efecto de antioxidantes*. PhD thesis, Universidad Nacional de La Plata.
- [Fernández et al., 2009] Fernández, J., Da Silva-Grigoletto, M. E., and Túnez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Revista andaluza de medicina del deporte*, 2(1):19–34.
- [Fernandez-Lazaro et al., 2023] Fernandez-Lazaro, D., Sanchez-Serrano, N., Rabail, R., Aadil, R. M., Mielgo-Ayuso, J., Radesca Fabiano, K., and Garrosa, E. (2023). Is probiotics supplementation an appropriate strategy to modulate inflammation in physically active healthy adults or athletes? a systematic review. *Applied Sciences*, 13(6):3448.
- [Fernández-Lázaro et al., 2022] Fernández-Lázaro, D., Seco-Calvo, J., Pascual-Fernández, J., Domínguez-Ortega, C., Del Valle Soto, M., and Mielgo-Ayuso, J. (2022). 6-week supplementation with tribulus terrestris l. to trained male crossfit® athletes on muscle, inflammation, and antioxidant biomarkers: A randomized, single-blind, placebo-controlled trial. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23):16158.
- [Fu et al., 2021] Fu, S.-K., Tseng, W.-C., Tseng, K.-W., Lai, C.-C., Tsai, Y.-C., Tai, H.-L., and Hsu, C.-C. (2021). Effect of daily oral lactobacillus plantarum ps128 on exercise capacity recovery after a half-marathon. *Nutrients*, 13(11):4023.
- [García Morales et al., 1998] García Morales, O. H., Pereira Roche, N., and Flores Sánchez, R. M. (1998). Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: mieloperoxidasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 17(3):190–197.
- [GitHub, 2024] GitHub (2024). Acerca de github y git. (Accessed on 10/14/2024).
- [Huang et al., 2018] Huang, W.-C., Hsu, Y.-J., Li, H., Kan, N.-W., Chen, Y.-M., Lin, J.-S., Hsu, T.-K., Tsai, T.-Y., Chiu, Y.-S., and Huang, C.-C. (2018). Effect of lactobacillus plantarum twk10 on improving endurance performance in humans. *Chin. J. Physiol*, 61(3):163–170.
- [IdiPaz, 2015] IdiPaz (2015). Pnt de pesada. (Accessed on 06/06/2024).
- [IMIM, 2003] IMIM (2003). terminologia.pdf. (Accessed on 06/02/2024).

- [Io, 2024] Io (2024). io — core tools for working with streams. (Accessed on 10/19/2024).
- [Irazusta et al., 2008] Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Ros, J., and Tamarit, J. (2008). Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas.
- [Ivot, nd] Ivot (n.d.). Estrés oxidativo - ivo3t. (Accessed on 06/04/2024).
- [Jones, 2006] Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10):1865–1879.
- [Kopka and Daly, 2003] Kopka, H. and Daly, P. W. (2003). *Guide to LaTeX*. Pearson Education.
- [Macedo-Márquez, 2012] Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (eros) en las mitocondrias de *saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15(2):97–103.
- [Matamoros, 2019] Matamoros, W. F. G. (2019). Sedentarismo en niños y adolescentes: Factor de riesgo en aumento. *Recimundo*, 3(1):1602–1624.
- [Matplotlib, 2024] Matplotlib (2024). Matplotlib: Python plotting. (Accessed on 10/19/2024).
- [Meister, 1988] Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of biological chemistry*, 263(33):17205–17208.
- [Microsoft, 2023] Microsoft (2023). Especificaciones y límites de excel - soporte técnico de microsoft. (Accessed on 06/07/2024).
- [Microsoft, 2024] Microsoft (2024). Visual studio code. (Accessed on 10/14/2024).
- [Molina-Heredia, 2012] Molina-Heredia, F. P. (2012). Sebbm divulgación la ciencia al alcance de la mano.
- [NumPy, 2024] NumPy (2024). Numpy. (Accessed on 10/14/2024).
- [Pacheco, 2011] Pacheco, E. M. (2011). *Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa*. PhD thesis, Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- [Pandas, 2024] Pandas (2024). Pandas. (Accessed on 10/14/2024).

- [Patashnik, 1984] Patashnik, O. (1984). Bibtex 101. *TUGboat*, 15:269–273.
- [Pathlib, 2024] Pathlib (2024). pathlib — object-oriented filesystem paths. (Accessed on 10/19/2024).
- [PeterHermesFurian, 2020] PeterHermesFurian (2020). Ilustración de Óxido nítrico dióxido de nitrógeno y Óxido nitroso gas de la risa y más vectores libres de derechos de Óxido nitroso - istock. (Accessed on 06/09/2024).
- [Pingouin, 2024] Pingouin (2024). Pingouin: A python package for statistical analysis. (Accessed on 10/14/2024).
- [Posit, 2024] Posit (2024). Shiny. (Accessed on 10/14/2024).
- [Przewłócka et al., 2023] Przewłócka, K., Kujach, S., Sawicki, P., Berezka, P., Bytowska, Z. K., Folwarski, M., Kowalski, K., and Kaczor, J. J. (2023). Effects of probiotics and vitamin d3 supplementation on sports performance markers in male mixed martial arts athletes: a randomized trial. *Sports Medicine-Open*, 9(1):31.
- [Python Software Foundation, 2024] Python Software Foundation (2024). Tutorial de python (versión 3). (Accessed on 10/14/2024).
- [Quevedo et al., 2003] Quevedo, S. T., Vidaillet, A. B., Alvarez, M. V., Lorié, O. A., and Ortega, M. F. (2003). Radicales libres y defensas antioxidantes. *Revista Información Científica*, 37(1):5.
- [Rioja Antezana et al., 2018] Rioja Antezana, A. P., Vizaluque, B. E., Aliaga-Rossel, E., Tejeda, L., Book, O., Mollinedo, P., and Peñarrieta, J. M. (2018). Determination of the total antioxidant capacity, total phenols, and the enzymatic activity in a non-diary beverage based on grains of chenopodium quinoa. *Revista Boliviana de Química*, 35(5):168–176.
- [Sadeer et al., 2020] Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., and Mahomoodally, F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety-chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9:709.
- [Santibañez-Gutierrez et al., 2022] Santibañez-Gutierrez, A., Fernández-Landa, J., Calleja-González, J., Delextrat, A., and Mielgo-Ayuso, J. (2022). Effects of probiotic supplementation on exercise with predominance of aerobic metabolism in trained population: A systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Nutrients*, 14(3):622.
- [SciPy, 2024] SciPy (2024). Scipy. (Accessed on 10/14/2024).

- [Shapiro and Wilk, 1965] Shapiro, S. S. and Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3-4):591–611.
- [Sies, 1985] Sies, H. (1985). What is oxidative stress? In *Oxidative stress and vascular disease*, pages 1–8. Springer.
- [Statgraphics, 2024] Statgraphics (2024). Statgraphics | data analysis solutions. (Accessed on 06/07/2024).
- [Stemart, nd] Stemart (n.d.). Gen5™ microplate reader and imager software, biotek instruments - stemart. (Accessed on 06/07/2024).
- [Sureda, 2018] Sureda, A. (2018). Sebbm divulgación la ciencia al alcance de la mano.
- [Sánchez Amador, 2021] Sánchez Amador, S. A. (2021). Método de bradford: qué es y cómo funciona. (Accessed on 06/05/2024).
- [Tsikas et al., 1999] Tsikas, D., Sandmann, J., Holzberg, D., Pantazis, P., Raida, M., and Frölich, J. (1999). Determination of s-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Analytical biochemistry*, 273:32–40.
- [UBU, 2022] UBU (2022). Laboratorio de investigación | universidad de burgos. (Accessed on 06/05/2024).
- [Uchida, 2003] Uchida, K. (2003). 4-hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research*, 42(4):318–343.
- [Universidad Carlos III de Madrid, 2024] Universidad Carlos III de Madrid (2024). Overleaf - editor online latex. (Accessed on 10/14/2024).
- [Valavanidis et al., 2009] Valavanidis, A., Vlachogianni, T., and Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-ohdg): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C*, 27(2):120–139.
- [Valko et al., 2007] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1):44–84.

- [Vásquez et al., 2017] Vásquez, V. E. B., Riquetti, H. A. G., and Morales, S. C. (2017). Estudio del ácido láctico en el crossfit: Aplicación en cuatro sesiones de entrenamiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 36(3):1–13.
- [Vázquez Tarragón, 2016] Vázquez Tarragón, A. (2016). *Perfil metabólico y de estrés oxidativo en la obesidad mórbida y su modulación tras cirugía bariátrica. Identificación de nuevos marcadores clínicos*. PhD thesis, Universitat de València.
- [Veglia et al., 2009] Veglia, F., Cavalca, V., and Tremoli, E. (2009). *OXY-SCORE: A Global Index to Improve Evaluation of Oxidative Stress by Combining Pro- and Antioxidant Markers*.
- [Waskom, 2024] Waskom, M. (2024). Seaborn: Statistical data visualization. (Accessed on 10/19/2024).
- [Weitner et al., 2016] Weitner, T., Inić, S., Jablan, J., Gabričević, M., and Domijan, A.-M. (2016). Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. *Croatica Chemica Acta*, 89.
- [Winkler, 2017] Winkler (2017). kit-proteinas-bradfor.pdf. (Accessed on 06/05/2024).
- [Zmora et al., 2018] Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S., Kotler, E., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Brik, R. B.-Z., et al. (2018). Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell*, 174(6):1388–1405.
- [Álvarez Calatayud, 2016] Álvarez Calatayud, D. G. (2016). Los probióticos tienen propiedades antioxidantes | el probiótico. (Accessed on 06/02/2024).
- [Álvarez Cardona et al., 2009] Álvarez Cardona, A., Yamazaki-Nakashimada, M., and Espinosa-Padilla, S. (2009). Enfermedad granulomatosa crónica. *Revista Alergia México*, 56:165–74.