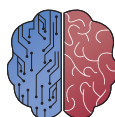




UNIVERSIDAD DE BURGOS
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR
Grado en Ingeniería de la Salud



INGENIERÍA
DE LA SALUD

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

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

Presentado por Ignacio González Arnaiz
en Universidad de Burgos

8 de julio de 2024

Tutores: 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 bifidobacterias 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, 8 de julio de 2024

Vº. Bº. del Tutor:

Dña. Natalia Busto Vázquez

Resumen

Este Trabajo de Fin de Grado afronta una investigación detallada acerca de la suplementación con probióticos y su impacto en el estrés oxidativo en atletas de Crossfit. Se conoce como estrés oxidativo un estado de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, que provoca daño molecular en el organismo.

Para el correcto desarrollo de la investigación, se ha seguido una metodología precisa con diversos ensayos para la obtención de biomarcadores específicos. Una vez obtenidos los resultados experimentales, han sido analizados detalladamente para estudiar su significancia estadística.

A pesar de los rigurosos protocolos experimentales, no se han apreciado diferencias estadísticamente significativas en los biomarcadores medidos antes y después de la suplementación con probióticos. Esto sugiere que, en este estudio, los probióticos no han tenido un efecto significativo en el estrés oxidativo de los atletas de Crossfit.

Descriptores

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

Abstract

This Final Degree Thesis deals with a detailed investigation of probiotic supplementation and its impact on oxidative stress in Crossfit athletes. Oxidative stress is known as a state of imbalance between oxidants and antioxidants, in favor of the former, which causes molecular damage in the body.

For the correct development of the research, a precise methodology has been followed with several assays to obtain specific biomarkers. Once the experimental results were obtained, they were analyzed in detail to study their statistical significance.

Despite the rigorous experimental protocols, no statistically significant differences were observed in the biomarkers measured before and after probiotic supplementation. This suggests that in this study, probiotics have not had a significant effect on oxidative stress in Crossfit athletes.

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	3
Conceptos teóricos	5
3.1. Estrés oxidativo	5
3.2. Radicales libres biológicos	6
3.3. Mecanismos de defensa antioxidantes	12
3.4. Biomarcadores de estrés oxidativo	15
3.5. Estrés oxidativo y salud humana	17
3.6. Estrés oxidativo y deporte	17
3.7. Crossfit	19
3.8. Estado del arte y trabajos relacionados	19
Metodología	23
4.1. Descripción de los datos	23
4.2. Técnicas y herramientas	25
Resultados	31
5.1. Resumen de resultados	31
5.2. Discusión	31
5.3. Análisis de la normalidad de los datos	32

5.4. Análisis de la homocedasticidad de varianzas	35
5.5. Análisis estadístico mediante ANOVA factorial de medidas repetidas	38
Conclusiones	43
6.1. Aspectos relevantes	44
Líneas de trabajo futuras	47
Bibliografía	51

Índice de figuras

3.1. Representación esquemática del estrés oxidativo [38]	5
3.2. Representación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) [21] .	8
3.3. Representación de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) [25]	9
3.4. Estructura de la NADPH oxidasa [55]	11
3.5. Reacción del anión peroxinitrito [4]	11
3.6. Reacción de Fenton y de Haber-Weiss [18]	12
3.7. Esquema del deporte y el estrés oxidativo [32]	18
4.1. Estructura de resonancia de la molécula del azul de Coomassie G-250 [50]	26
4.2. Estructura de la 2,4-dinitrofenilhidracina [44]	26
4.3. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico [43] . .	27
4.4. Reducción del ion férrico a ion ferroso [29]	28
4.5. Reacción entre el glutatión reducido y el o-ftalaldehído [33] . . .	28
5.1. Test de Shapiro-Wilk para Bradford. Fuente propia con Stat- graphics.	32
5.2. Test de Shapiro-Wilk para Nanodrop. Fuente propia con Stat- graphics.	32
5.3. Test de Shapiro-Wilk para Carbonilos. Fuente propia con Stat- graphics.	33
5.4. Test de Shapiro-Wilk para Malondialdehído. Fuente propia con Statgraphics.	33
5.5. Test de Shapiro-Wilk para Ferric Reducing Antioxidant Power. Fuente propia con Statgraphics.	34
5.6. Test de Shapiro-Wilk para Glutatión Reducido. Fuente propia con Statgraphics.	34
5.7. Test de Shapiro-Wilk para Glutatión Disulfuro. Fuente propia con Statgraphics.	34

5.8. Test de Levene para Bradford. Fuente propia con Statgraphics. .	35
5.9. Test de Levene para Nanodrop. Fuente propia con Statgraphics. .	35
5.10. Test de Levene para Carbonilos. Fuente propia con Statgraphics. .	36
5.11. Test de Levene para Malondialdehído. Fuente propia con Statgraphics.	36
5.12. Test de Levene para Ferric Reducing Antioxidant Power. Fuente propia con Statgraphics.	37
5.13. Test de Levene para Glutación Reducido. Fuente propia con Statgraphics.	37
5.14. Test de Levene para Glutación Disulfuro. Fuente propia con Statgraphics.	38
5.15. Test ANOVA para Bradford. Fuente propia con Statgraphics. . .	38
5.16. Test ANOVA para Nanodrop. Fuente propia con Statgraphics. .	39
5.17. Test ANOVA para Carbonilos. Fuente propia con Statgraphics. .	39
5.18. Test ANOVA para Malondialdehído. Fuente propia con Statgraphics.	40
5.19. Test ANOVA para Ferric Reducing Antioxidant Power. Fuente propia con Statgraphics.	41
5.20. Test ANOVA para Glutación Reducido. Fuente propia con Statgraphics.	41
5.21. Test ANOVA para Glutación Disulfuro. Fuente propia con Statgraphics.	42

Índice de tablas

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 [15] 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* 10 billones de 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. 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 (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.

Objetivos

El objetivo central de este Trabajo de Fin de Grado es el estudio de la suplementación con *Lactobacillus plantarum* 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.

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:

1. Llevar a cabo una evaluación del daño oxidativo y la capacidad antioxidante en plasma antes y después del ejercicio con y sin la suplementación.
2. Evaluar el efecto del ejercicio intenso sobre el estado oxidativo y la capacidad antioxidante.
3. Adquirir conocimientos y habilidades en técnicas de laboratorio básicas para la determinación de distintos biomarcadores de estrés oxidativo en el plasma sanguíneo.
4. Profundizar en los conocimientos sobre la fisiología del ejercicio, más específicamente en lo referente al estrés oxidativo y el daño muscular.
5. Establecer sólidos protocolos de trabajo para la determinación de distintos biomarcadores de estrés oxidativo.

6. Cuantificar mediante la realización de rectas de calibrados los diferentes parámetros del estado oxidativo a través de softwares específicos (Gen5 2.09).
7. Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el laboratorio utilizando softwares específicos (Statgraphics).
8. Interpretar los resultados obtenidos para determinar si la intervención disminuye el estrés oxidativo generado por el ejercicio intenso.

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 [46].



Figura 3.1: Representación esquemática del estrés oxidativo [38]

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 [17]. Esta redefinición se estableció debido a nuevas evidencias científicas en las que se realizaron los siguientes hallazgos [24]:

- 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 [54].

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 [24].

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) [24]. 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 hidroperóxido (HO_2^-) y el radical hidroxilo (OH). 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 [12].

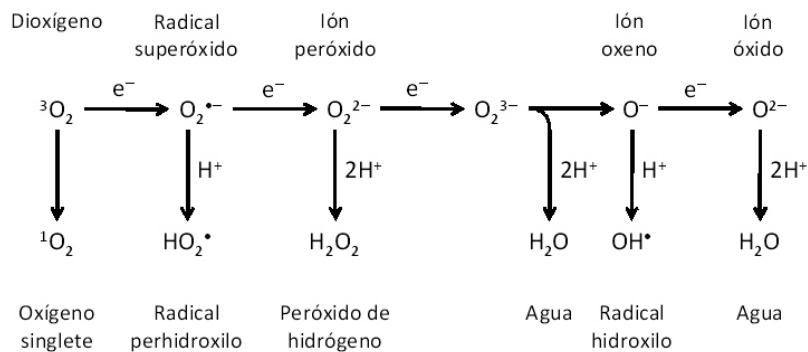


Figura 3.2: Representación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) [21]

- 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 [12].
- 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_2) (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_2), que a su vez genera junto con el oxígeno, el peroxinitrito (ONOO^-), que es una especie elevadamente reactiva. Del mismo modo, existen otros radicales libres de diferente naturaleza como son el ión hipoclorito (ClO^-) y el radical triclorometilo (CCl_3). El radical triclorometilo se produce por la acción del citocromo P450 durante el metabolismo del tetracloruro de carbono (CCl_4) [12].

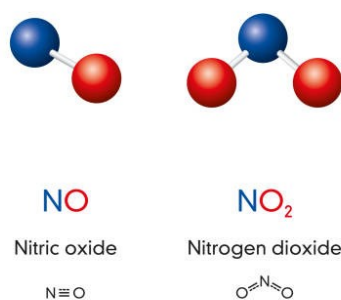


Figura 3.3: Representación de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) [25]

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 [27].

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 [13].

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 [13].

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 [5]. 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 [24] (Figura 3.4).
- **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

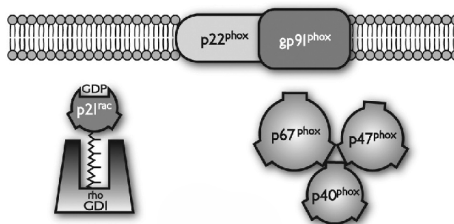


Figura 3.4: Estructura de la NADPH oxidasa [55]

y procesos inflamatorios [5]. 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 [49].
- 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 [5] (Figura 3.5). Podemos distinguir tres isoformas de esta enzima, la I, la II y la III.



Figura 3.5: Reacción del anión peroxinitrito [4]

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 [39].

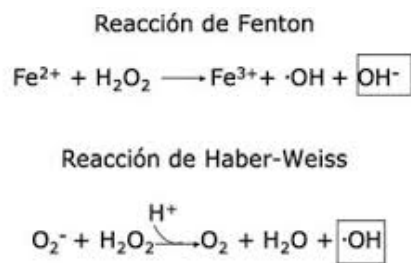


Figura 3.6: Reacción de Fenton y de Haber-Weiss [18]

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 [39].

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 [41]. 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 [24] [41].
- 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 [24] [41].

- **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 hidroperóxidos de fosfolípidos, la plasmática y la forma gastrointestinal [24] [41].

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 [41].
- **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 [20] [41].

- 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 α -tocoferol, 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 [41].

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 [22]. 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 [6]. Estos biomarcadores deben de cumplir una serie de condiciones para que se les pueda considerar válidos como biomarcadores de estrés oxidativo [24]:

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 [41].
- 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 [2]. 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 [35].
- 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 [37] [41].

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 [11]:

- 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 [13].

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 [19], 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 [13], 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 [32]. 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 [32], como se muestra en la figura 3.7.

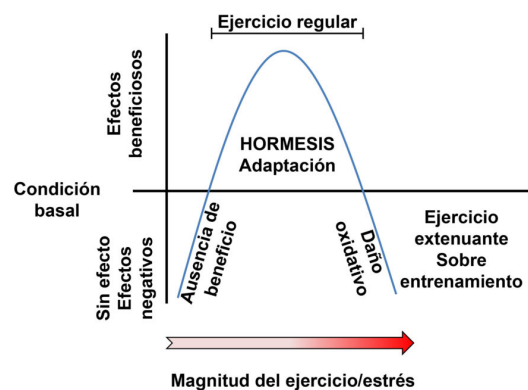


Figura 3.7: Esquema del deporte y el estrés oxidativo [32]

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.

El Crossfit es un sistema de entrenamiento que se caracteriza por su variación de ejercicios combinado con movimientos intensos de tipo funcional [40]. 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 [9], 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 [26] 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.

Según el estudio del estrés oxidativo inducido por el ejercicio de la Revista Andaluza de Medicina del Deporte [13], 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 [8], que consistió en una revisión bibliográfica, reveló que dicha suplementación en atletas de élite mejoró la funcionalidad del sistema inmunitario, que estaba previamente debilitado a causa del sobreentrenamiento. Las cepas de probióticos que mejoraron la función inmunitaria fueron las bacterias del ácido láctico, concretamente *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium*.

El 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. Sin embargo, la evidencia actual acerca de este tema es aún muy limitada, especialmente en el contexto de los deportistas de Crossfit. Son necesarios más estudios de calidad que determinen las cepas, dosis y protocolos óptimos de suplementación con probióticos en la población atlética, ya que la mayoría de los estudios realizados son revisiones bibliográficas que no se centran en deportistas de Crossfit, y muchas estudian otros tipos de suplementaciones.

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 recibe placebo (cápsula de 2g de dextrosa) y un grupo PROBIÓTICO que fue suplementado 10 billones de UFC de *Lactobacillus plantarum* 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.

El club deportivo se encargó de la extracción de sangre y las muestras llegaron a la Universidad de Burgos anonimizadas. Se extrajo el plasma a las 24h de la recepción manteniéndose a 4°C. Las muestras de plasma se alícuotizaron (para evitar el daño de los ciclos de congelación y descongelación) y se mantuvieron a - 80°C.

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. El reclutamiento fue llevado a cabo por el profesor Juan 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).

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 [34]. 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 [1]. 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 [52]. 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.
- 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

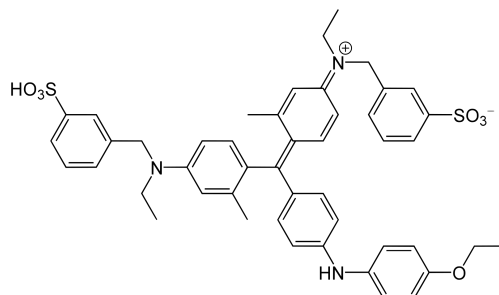


Figura 4.1: Estructura de resonancia de la molécula del azul de Coomassie G-250 [50]

utilizar cubetas ya que solo necesita de un volumen de muestra de 1 μL [14].

2. Técnicas para la cuantificación de proteínas carboniladas:

- 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 [16].

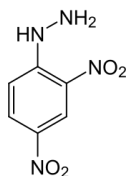


Figura 4.2: Estructura de la 2,4-dinitrofenilhidracina [44]

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) [36].

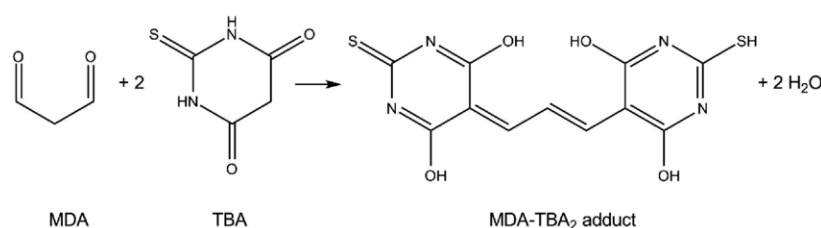


Figura 4.3: Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico [43]

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 [28].

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 [24].

6. Técnicas para la cuantificación del glutatión oxidado:

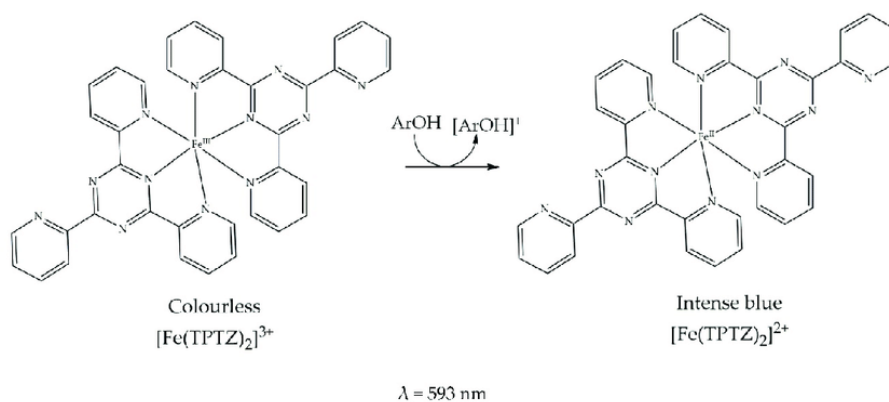


Figura 4.4: Reducción del ion férrico a ion ferroso [29]

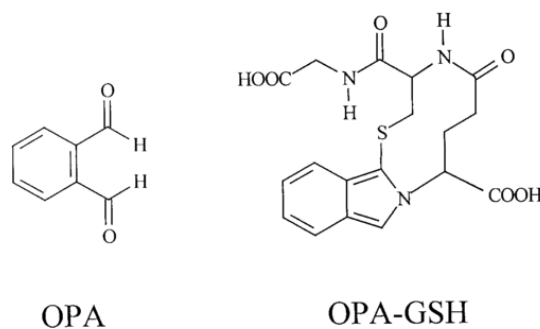


Figura 4.5: Reacción entre el glutatión reducido y el o-ftalaldehído [33]

- 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 [24].

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 [31].

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 [48] [10].

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 [30].

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 [47].

5. 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 [45].

Resultados

5.1. Resumen de resultados

Tras haber realizado el estudio exhaustivo sobre la suplementación con probióticos y su impacto en el estrés oxidativo de deportistas de Crossfit, puedo afirmar que no se han obtenido resultados estadísticamente significativos. Las diferencias encontradas en los niveles de proteínas plasmáticas en los grupos CONTROL y PROBIÓTICO antes y después de la suplementación no son estadísticamente relevantes, al igual que los niveles de glutatión reducido y oxidado, la concentración de proteínas carboniladas, los niveles de peroxidación lipídica y la capacidad antioxidante total.

5.2. Discusión

Para un correcto análisis estadístico, se ha utilizado 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 [51] ya que el tamaño de muestras es de 24 sujetos y la homocedasticidad de varianzas con el test de Levene [7]. 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.

5.3. Análisis de la normalidad de los datos

Cuantificación de proteínas

Bradford

Antes de realizar el ANOVA, se estudia la normalidad de la muestra mediante el test de Shapiro-Wilk (Figura 5.1):

Pruebas de Normalidad para POST-PRE		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,946541	0,2477

Figura 5.1: Test de Shapiro-Wilk para Bradford. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.2477) es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis de que las muestras provengan de una distribución normal.

Nanodrop

Antes de realizar el ANOVA, se estudia la normalidad de la muestra mediante el test de Shapiro-Wilk (Figura 5.2):

Pruebas de Normalidad para POST-PRE		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,969427	0,675279

Figura 5.2: Test de Shapiro-Wilk para Nanodrop. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.675279) es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis de que las muestras provengan de una distribución normal.

Cuantificación de proteínas carboniladas

Carbonilos

Antes de realizar el ANOVA, se estudia la normalidad de la muestra mediante el test de Shapiro-Wilk (Figura 5.3):

Pruebas de Normalidad para POST-PRE		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,96178	0,500243

Figura 5.3: Test de Shapiro-Wilk para Carbonilos. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.500243) es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis de que las muestras provengan de una distribución normal.

Cuantificación de peroxidación lipídica

Malondialdehído (MDA)

Antes de realizar el ANOVA, se estudia la normalidad de la muestra mediante el test de Shapiro-Wilk (Figura 5.4):

Pruebas de Normalidad para POST-PRE		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,947497	0,259455

Figura 5.4: Test de Shapiro-Wilk para Malondialdehído. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.259455) es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis de que las muestras provengan de una distribución normal.

Cuantificación de la capacidad antioxidante total

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Antes de realizar el ANOVA, se estudia la normalidad de la muestra mediante el test de Shapiro-Wilk (Figura 5.5):

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.129229) es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis de que las muestras provengan de una distribución normal.

Pruebas de Normalidad para POST-PRE		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,935472	0,129229

Figura 5.5: Test de Shapiro-Wilk para Ferric Reducing Antioxidant Power. Fuente propia con Statgraphics.

Cuantificación del glutatión reducido

Glutatión Reducido (GSH)

Antes de realizar el ANOVA, se estudia la normalidad de la muestra mediante el test de Shapiro-Wilk (Figura 5.6):

Pruebas de Normalidad para POST-PRE		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,948045	0,266407

Figura 5.6: Test de Shapiro-Wilk para Glutatión Reducido. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.266407) es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis de que las muestras provengan de una distribución normal.

Cuantificación del glutatión oxidado

Glutatión Disulfuro (GSSG)

Antes de realizar el ANOVA, se estudia la normalidad de la muestra mediante el test de Shapiro-Wilk (Figura 5.7):

Pruebas de Normalidad para POST-PRE		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,950008	0,292742

Figura 5.7: Test de Shapiro-Wilk para Glutatión Disulfuro. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.292742) es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis de que las muestras provengan de una distribución normal.

5.4. Análisis de la homocedasticidad de varianzas

Cuantificación de proteínas

Bradford

En segundo lugar, se analiza la homocedasticidad de varianzas mediante el test de Levene (Figura 5.8):

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	2,67186	0,1170

Figura 5.8: Test de Levene para Bradford. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.1170) es mayor o igual a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, confirmando la homocedasticidad de varianzas.

Nanodrop

En segundo lugar, se analiza la homocedasticidad de varianzas mediante el test de Levene (Figura 5.9):

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,767868	0,3908

Figura 5.9: Test de Levene para Nanodrop. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.3908) es mayor o igual a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, confirmando la homocedasticidad de varianzas.

Cuantificación de proteínas carboniladas

Carbonilos

En segundo lugar, se analiza la homocedasticidad de varianzas mediante el test de Levene (Figura 5.10):

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,41991	0,5240

Figura 5.10: Test de Levene para Carbonilos. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.5240) es mayor o igual a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, confirmando la homocedasticidad de varianzas.

Cuantificación de peroxidación lipídica

Malondialdehído (MDA)

En segundo lugar, se analiza la homocedasticidad de varianzas mediante el test de Levene (Figura 5.11):

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,753667	0,3951

Figura 5.11: Test de Levene para Malondialdehído. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.3951) es mayor o igual a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, confirmando la homocedasticidad de varianzas.

Cuantificación de la capacidad antioxidante total

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

En segundo lugar, se analiza la homocedasticidad de varianzas mediante el test de Levene (Figura 5.12):

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,992844	0,3299

Figura 5.12: Test de Levene para Ferric Reducing Antioxidant Power. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.3299) es mayor o igual a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, confirmando la homocedasticidad de varianzas.

Cuantificación del glutatión reducido

Glutatión Reducido (GSH)

En segundo lugar, se analiza la homocedasticidad de varianzas mediante el test de Levene (Figura 5.13):

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,0210338	0,8861

Figura 5.13: Test de Levene para Glutatión Reducido. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.8861) es mayor o igual a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, confirmando la homocedasticidad de varianzas.

Cuantificación del glutatión oxidado

Glutatión Disulfuro (GSSG)

En segundo lugar, se analiza la homocedasticidad de varianzas mediante el test de Levene (Figura 5.14):

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,0122443	0,9129

Figura 5.14: Test de Levene para Glutatión Disulfuro. Fuente propia con Statgraphics.

Podemos afirmar con un nivel de confianza del 95 % que, como el p-valor obtenido (0.9129) es mayor o igual a 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, confirmando la homocedasticidad de varianzas.

5.5. Análisis estadístico mediante ANOVA factorial de medidas repetidas

Cuantificación de proteínas

Bradford

Por último y una vez verificadas la normalidad muestral y la homocedasticidad de varianzas, se lleva a cabo el ANOVA factorial de medidas repetidas (Figura 5.15):

Análisis de Varianza para EFECTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	15,3985	24	0,641605	0,71	0,7941
Residuo	19,0471	21	0,907006		
Total (Corr.)	34,4457	45			

Figura 5.15: Test ANOVA para Bradford. Fuente propia con Statgraphics.

Como el p-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 %.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE ANOVA FACTORIAL DE MEDIDAS REPETIDAS 39

Los resultados obtenidos en el ANOVA concluyen que el número de proteínas detectado por Bradford no presenta una variación estadísticamente significativa tras la suplementación.

Nanodrop

Por último y una vez verificadas la normalidad muestral y la homocedasticidad de varianzas, se lleva a cabo el ANOVA factorial de medidas repetidas (Figura 5.16):

Análisis de Varianza para EFECTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	42,1256	24	1,75523	1,58	0,1473
Residuo	23,3588	21	1,11233		
Total (Corr.)	65,4845	45			

Figura 5.16: Test ANOVA para Nanodrop. Fuente propia con Statgraphics.

Como el p-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 %.

Los resultados obtenidos en el ANOVA concluyen que el número de proteínas detectado con por Nanodrop no presenta una variación estadísticamente significativa tras la suplementación.

Cuantificación de proteínas carboniladas

Carbonilos

Por último y una vez verificadas la normalidad muestral y la homocedasticidad de varianzas, se lleva a cabo el ANOVA factorial de medidas repetidas (Figura 5.17):

Análisis de Varianza para EFECTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	7496,91	24	312,371	1,53	0,1639
Residuo	4285,61	21	204,077		
Total (Corr.)	11782,5	45			

Figura 5.17: Test ANOVA para Carbonilos. Fuente propia con Statgraphics.

Como el p-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 %.

Los resultados obtenidos en el ANOVA concluyen que el número de proteínas carboniladas detectado por Carbonilos no presenta una variación estadísticamente significativa tras la suplementación.

Cuantificación de peroxidación lipídica

Malondialdehído (MDA)

Por último y una vez verificadas la normalidad muestral y la homocedasticidad de varianzas, se lleva a cabo el ANOVA factorial de medidas repetidas (Figura 5.18):

Análisis de Varianza para EFECTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3,92407	24	0,163503	1,99	0,0573
Residuo	1,72215	21	0,082007		
Total (Corr.)	5,64621	45			

Figura 5.18: Test ANOVA para Malondialdehído. Fuente propia con Statgraphics.

Como el p-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 %.

Los resultados obtenidos en el ANOVA concluyen que la cuantificación de peroxidación lipídica detectada por Malondialdehído no presenta una variación estadísticamente significativa tras la suplementación.

Cuantificación de la capacidad antioxidante total

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Por último y una vez verificadas la normalidad muestral y la homocedasticidad de varianzas, se lleva a cabo el ANOVA factorial de medidas repetidas (Figura 5.19):

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIANTE ANOVA FACTORIAL DE MEDIDAS REPETIDAS

41

Análisis de Varianza para EFECTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2365,64	25	94,6254	1,71	0,1044
Residuo	1219,39	22	55,4269		
Total (Corr.)	3585,03	47			

Figura 5.19: Test ANOVA para Ferric Reducing Antioxidant Power. Fuente propia con Statgraphics.

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 %.

Los resultados obtenidos en el ANOVA concluyen que la cuantificación de la capacidad antioxidante total detectada por Ferric Reducing Antioxidant Power no presenta una variación estadísticamente significativa tras la suplementación.

Cuantificación del glutatión reducido

Glutatión Reducido (GSH)

Por último y una vez verificadas la normalidad muestral y la homocedasticidad de varianzas, se lleva a cabo el ANOVA factorial de medidas repetidas (Figura 5.20):

Análisis de Varianza para EFECTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	7069,18	24	294,549	1,18	0,3536
Residuo	5245,05	21	249,764		
Total (Corr.)	12314,2	45			

Figura 5.20: Test ANOVA para Glutatión Reducido. Fuente propia con Statgraphics.

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 %.

Los resultados obtenidos en el ANOVA concluyen que la cuantificación del glutatión reducido detectada por GSH no presenta una variación estadísticamente significativa tras la suplementación.

Cuantificación del glutatión oxidado

Glutatión Disulfuro (GSSG)

Por último y una vez verificadas la normalidad muestral y la homocedasticidad de varianzas, se lleva a cabo el ANOVA factorial de medidas repetidas (Figura 5.21):

Análisis de Varianza para EFECTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1256,0	24	52,3334	1,62	0,1334
Residuo	677,784	21	32,2754		
Total (Corr.)	1933,79	45			

Figura 5.21: Test ANOVA para Glutatión Disulfuro. Fuente propia con Statgraphics.

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 %.

Los resultados obtenidos en el ANOVA concluyen que la cuantificación del glutatión oxidado detectada por GSSG no presenta una variación estadísticamente significativa tras la suplementación.

Conclusiones

La conclusión general a la que se ha llegado con este estudio es que la suplementación con probióticos no tiene consecuencias significativas sobre el estrés oxidativo en deportistas de Crossfit. Esto es debido a que ninguno de los biomarcadores analizados ha mostrado una variación estadísticamente significativa tras la suplementación, pues no ha habido un cambio en la concentración de proteínas plasmáticas, en el nivel de proteínas carboniladas, en la peroxidación lipídica, en la capacidad antioxidante ni en el nivel de glutatión reducido y oxidado.

Sin embargo, estos resultados no pueden darse por definitivos, ya que, para poder desechar el efecto de la suplementación, deberíamos considerar otros factores como el sexo, edad, o niveles de partida, es decir, en estado basal. Además, 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).

Los antecedentes bibliográficos encontrados respaldan el efecto beneficioso de los probióticos en otro tipo de deportistas, como por ejemplo una mejora en la recuperación, la función inmune y el rendimiento, sin embargo, los conocimientos científicos son aún limitados para los atletas de Crossfit. Esto es debido entre otras cosas, a la escasez de ensayos donde se describan los efectos de la suplementación con probióticos en el estado oxidativo de deportistas de Crossfit. Cabe destacar otros ensayos como por ejemplo el estudio de la mejora del rendimiento deportivo en atletas que consumen probióticos [3], donde se lleva a cabo una revisión bibliográfica sobre la suplementación con probióticos en atletas (indistintamente del deporte). Este estudio llegó a la conclusión que dicha suplementación mejora la función

inmune (reduciendo infecciones respiratorias y síntomas gastrointestinales) de los atletas, permitiéndoles mantener el rendimiento. Sugirió también que los probióticos podrían modular la inflamación y el estrés oxidativo inducidos por el ejercicio intenso.

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. 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).

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 (82 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, 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.

Concluyendo, este TFG me ha brindado la oportunidad de profundizar en el campo experimental de la titulación, más precisamente en el campo de la biología molecular. 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 y que permitan seguir mejorando progresivamente los servicios sanitarios.

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 [42]. 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 com-

paración 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. 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. Igualmente, se podría estudiar la combinación con antioxidantes específicos como por ejemplo los polifenoles, para evaluar si su combinación afectaría en el estrés oxidativo. Los polifenoles están presentes en frutos como las fresas, y son compuestos con altas propiedades antioxidantes. Algunos estudios han probado en modelos animales y en estudios clínicos como la fresa es un buen alimento para disminuir el estrés oxidativo, previniendo el desarrollo de enfermedades en el ser humano [23]. Otra opción para la expansión de protocolos de suplementación 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 [53].

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

Una última 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.

Bibliografía

- [1] Samuel Antonio Sánchez Amador. Método de bradford: qué es y cómo funciona. <https://psicologiaymente.com/cultura/metodo-bradford>. (Accessed on 06/05/2024).
- [2] Antonio Ayala, Mario F Muñoz, and Sandro Argüelles. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014(1):360438, 2014.
- [3] Violeta Belda Borja. Mejora del rendimiento deportivo en atletas que consumen probióticos. revisión bibliográfica sistemática. 2021.
- [4] Dr. Mariano Bueno. Fibromialgia síntomas. <https://biosalud.org/blog/sintomas-de-la-fibromialgia/>. (Accessed on 06/04/2024).
- [5] Carlos Carvajal Carvajal. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1):91–100, 2019.
- [6] Isabella Dalle-Donne, Ranieri Rossi, Roberto Colombo, Daniela Gius-tarini, and Aldo Milzani. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4):601–623, 2006.
- [7] DATAtab. Prueba de levene - explicación sencilla | datatab. <https://datatab.es/tutorial/levene-test>. (Accessed on 06/09/2024).
- [8] María Delgado Ovejero. Estudio de los efectos de la suplementación con probióticos sobre el sistema inmunitario en deportistas de alto rendimiento. revisión bibliográfica. 2020.

- [9] Jara Díaz-Jiménez, Eduardo Sánchez-Sánchez, Francisco Javier Ordoñez, Ignacio Rosety, Antonio Jesús Díaz, Manuel Rosety-Rodriguez, Miguel Ángel Rosety, and Francisco Brenes. Impact of probiotics on the performance of endurance athletes: A systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21):11576, 2021.
- [10] Martín Durán. Para qué sirve excel, principales características y cómo funciona. <https://blog.hubspot.es/marketing/para-que-sirve-excel>. (Accessed on 06/07/2024).
- [11] JI Elejalde Guerra. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *Anales de medicina interna*, volume 18, pages 50–59. SciELO Espana, 2001.
- [12] Martha Angélica Quintanar Escorza and José Víctor Calderón Salinas. La capacidad antioxidante total. bases y aplicaciones. *Revista de educación bioquímica*, 28(3):89–101, 2009.
- [13] JM Fernández, Marzo Edir Da Silva-Grigoletto, and I Túnez-Fiñana. Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Revista andaluza de medicina del deporte*, 2(1):19–34, 2009.
- [14] IdiPaz. Pnt de pesada. [https://www.idipaz.es/ficheros/files/Que%20es/2015/NANODROP\(2\).pdf](https://www.idipaz.es/ficheros/files/Que%20es/2015/NANODROP(2).pdf). (Accessed on 06/06/2024).
- [15] IMIM. terminologia.pdf. <https://www.imim.cat/media/upload/arxius/terminologia.pdf>. (Accessed on 06/02/2024).
- [16] Verónica Irazusta, Armando Moreno-Cermeño, Joaquim Ros, and Jordi Tamarit. Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. 2008.
- [17] Dean P Jones. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10):1865–1879, 2006.
- [18] Alain Macedo-Márquez. 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, 2012.
- [19] Washington Fabricio García Matamoros. Sedentarismo en niños y adolescentes: Factor de riesgo en aumento. *Recimundo*, 3(1):1602–1624, 2019.

- [20] Alton Meister. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of biological chemistry*, 263(33):17205–17208, 1988.
- [21] Fernando P Molina-Heredia. Sebbm divulgación la ciencia al alcance de la mano. 2012.
- [22] NIH. Definición de biomarcador - diccionario de cáncer del nci - nci. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/biomarcador>. (Accessed on 06/03/2024).
- [23] Cecilia Isabel Oviedo-Solís, Sinthia Cornejo-Manzo, Blanca Olivia Murillo-Ortiz, Michelle Montserrat Guzmán-Barrón, and Joel Ramírez-Emiliano. Los polifenoles de la fresa disminuyen el estrés oxidativo en enfermedades crónicas. *Gaceta médica de México*, 154(1):80–86, 2018.
- [24] Elio Mujica Pacheco. *Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa*. PhD thesis, Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2011.
- [25] PeterHermesFurian. Ilustración de Óxido nítrico dióxido de nitrógeno y Óxido nitroso gas de la risa y más vectores libres de derechos de Óxido nitroso - istock. <https://www.istockphoto.com/es/vector/%C3%B3xido-n%C3%ADtrico-di%C3%B3xido-de-nitr%C3%B3geno-y-%C3%B3xido-nitroso-gas-de-la-risa-gm1199736699-343378174>. (Accessed on 06/09/2024).
- [26] Katarzyna Przewłócka, Sylwester Kujach, Piotr Sawicki, Paweł Berezka, Zofia Kinga Bytowska, Marcin Folwarski, Kondrat Kowalski, and Jan Jacek Kaczor. 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, 2023.
- [27] Sara Terrado Quevedo, Armando Barthelemy Vidaillet, Marta Valls Alvarez, Odalys Armand Lorié, and Maritza Fernández Ortega. Radicales libres y defensas antioxidantes. *Revista Información Científica*, 37(1):5, 2003.
- [28] Alejandra P Rioja Antezana, Beatriz E Vizaluque, Enzo Aliaga-Rossel, Leslie Tejeda, Olof Book, Patricia Mollinedo, and J Mauricio Peñarrieta. 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, 2018.

- [29] Nabeelah Sadeer, Domenico Montesano, Stefania Albrizio, Gokhan Zengin, and Fawzi Mahomoodally. The versatility of antioxidant assays in food science and safety-chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9:709, 08 2020.
- [30] STATGRAPHICS. Statgraphics | data analysis solutions. <https://www.statgraphics.com/>. (Accessed on 06/07/2024).
- [31] STEMART. Gen5™ microplate reader and imager software, biotek instruments - stemart. <https://www.ste-mart.com/gen5-microplate-reader-and-imager-software-biotek-instruments-11505.htm>. (Accessed on 06/07/2024).
- [32] Antoni Sureda. Sebbm divulgación la ciencia al alcance de la mano. 2018.
- [33] Dimitrios Tsikas, Jörg Sandmann, David Holzberg, Periklis Pantazis, Manfred Raida, and Jürgen Frölich. 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, 09 1999.
- [34] UBU. Laboratorio de investigación | universidad de burgos. <https://www.ubu.es/facultad-de-ciencias-de-la-salud/informacion-general/recursos-materiales/laboratorio-de-investigacion-0>. (Accessed on 06/05/2024).
- [35] Koji Uchida. 4-hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research*, 42(4):318–343, 2003.
- [36] UNP. Microsoft word - tesis final.docx. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2739/Anexo.pdf?sequence=12&isAllowed=y>. (Accessed on 06/06/2024).
- [37] Athanasios Valavanidis, Thomais Vlachogianni, and Constantinos Fiotakis. 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, 2009.
- [38] Instituto valenciano de ozonoterapia. EstrÉs oxidativo - ivo3t. <https://www.institutovalencianodeozonoterapia.com/estres-oxidativo/>. (Accessed on 06/04/2024).

- [39] Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark TD Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1):44–84, 2007.
- [40] Vicente Enrique Brito Vásquez, Hernán Alberto Granizo Riquetti, and Santiago Calero Morales. Estudio del ácido láctico en el crossfit: Aplicación en cuatro sesiones de entrenamiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 36(3):1–13, 2017.
- [41] Antonio Vázquez Tarragón. *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, 2016.
- [42] Fabrizio Veglia, Viviana Cavalca, and Elena Tremoli. *OXY-SCORE: A Global Index to Improve Evaluation of Oxidative Stress by Combining Pro- and Antioxidant Markers*. 9 2009.
- [43] Tin Weitner, Suzana Inić, Jasna Jablan, Mario Gabričević, and Ana-Marija Domijan. Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. *Croatica Chemica Acta*, 89, 06 2016.
- [44] Wikipedia. 2,4-dinitrophenylhydrazine — wikipédia. <https://fr.wikipedia.org/wiki/2,4-Dinitroph%C3%A9nylhydrazine>. (Accessed on 06/06/2024).
- [45] Wikipedia. Bibtex - wikipedia, la enciclopedia libre. <https://es.wikipedia.org/wiki/BibTeX>. (Accessed on 06/07/2024).
- [46] Wikipedia. Helmut sies - wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Helmut_Sies. (Accessed on 06/02/2024).
- [47] Wikipedia. Latex - wikipedia, la enciclopedia libre. <https://es.wikipedia.org/wiki/LaTeX>. (Accessed on 06/07/2024).
- [48] Wikipedia. Microsoft excel - wikipedia, la enciclopedia libre. https://es.wikipedia.org/wiki/Microsoft_Excel. (Accessed on 06/07/2024).
- [49] Wikipedia. Mieloperoxidasa - wikipedia, la enciclopedia libre. <https://es.wikipedia.org/wiki/Mieloperoxidasa>. (Accessed on 06/03/2024).

- [50] Wikipedia. Método de bradford - wikipedia, la enciclopedia libre. https://es.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9todo_de_Bradford. (Accessed on 06/05/2024).
- [51] Wikipedia. Prueba de shapiro-wilk - wikipedia, la enciclopedia libre. https://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_de_Shapiro-Wilk. (Accessed on 06/09/2024).
- [52] Winkler. kit-proteinas-bradfor.pdf. <https://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/kit-proteinas-bradfor.pdf>. (Accessed on 06/05/2024).
- [53] Niv Zmora, Gili Zilberman-Schapira, Jotham Suez, Uria Mor, Mally Dori-Bachash, Stavros Bashiardes, Eran Kotler, Maya Zur, Dana Regev-Lehavi, Rotem Ben-Zeev Brik, et al. Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell*, 174(6):1388–1405, 2018.
- [54] Dr. Guillermo Álvarez Calatayud. Los probióticos tienen propiedades antioxidantes | el probiótico. <https://www.elprobiotico.com/los-probioticos-tienen-propiedades-antioxidantes/>. (Accessed on 06/02/2024).
- [55] Aristóteles Álvarez Cardona, Marco Yamazaki-Nakashimada, and Sara Espinosa-Padilla. Enfermedad granulomatosa crónica. *Revista Alergia México*, 56:165–74, 01 2009.