

Monograph

# Estado Funcional e Inflamación después de un Programa de Entrenamiento de Pre-temporada en Jugadores de Fútbol Profesionales y Recreacionales: Un Enfoque Proteómico

Francisco J Martín-Sánchez<sup>2</sup>, José María Villalón<sup>3</sup>, José J Zamorano-León<sup>1</sup>, Luis Fernández Rosas<sup>3</sup>, Ricardo Proietti<sup>1</sup>, Petra J Mateos-Caceres<sup>1</sup>, Juan J González-Armengol<sup>2</sup>, Pedro Villarreal<sup>2</sup>, Carlos Macaya<sup>1</sup> y Antonio J López-Farré<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cardiovascular Research Unit, Cardiology Department.

<sup>2</sup>Emergency Unit, Hospital Clínico San Carlos

<sup>3</sup>Medical Department of Atlético de Madrid Football Club, Madrid, Spain

## RESUMEN

El propósito de este estudio fue determinar si un programa de entrenamiento de pre-temporada modifica el estado inflamatorio de los jugadores de fútbol profesionales, y si este perfil inflamatorio puede asociarse con el estado físico. Se compararon los biomarcadores de las proteínas plasmáticas, utilizando la proteómica, y el estado fisiológico y la función cardíaca de 12 jugadores de fútbol profesionales y 9 jugadores de fútbol recreacionales. Después del programa de entrenamiento de pre-temporada previo a la competencia, se halló una reducción en la variabilidad cardíaca de baja frecuencia [LF] con respecto a los jugadores de fútbol recreacionales. No se hallaron diferencias en la variabilidad cardíaca de alta frecuencia [HF], en la relación alta frecuencia/ baja frecuencia, el índice de tensión ni en el volumen de consumo de oxígeno. Los niveles de isotipo 3 de alfa-1-antitripsina, los isotipos 1, 2 y 3 de gama-fibrinogeno y el isotipo 1 de proteína de unión a vitamina D se redujeron en los jugadores profesionales en comparación con los de los jugadores recreacionales. Sin embargo, se halló un mayor contenido de isotipo 6 de alfa-1-antitripsina y alfa 1-antiquimotripsina 1 y 4 en los jugadores de fútbol profesionales. El análisis de Spearman mostró una correlación positiva entre la LF y el isotipo 3 de la cadena gama del fibrinogeno; pero la LF guardó una relación negativa con el isotipo 4 de alfa-antiquimotripsina. Los jugadores de fútbol profesionales que se sometieron a un entrenamiento intensivo mostraron diferencias en el contenido de proteínas plasmáticas asociado al estrés inflamatorio/oxidativo y la trombosis con respecto a los jugadores de fútbol recreacionales. El análisis de proteómica, en combinación con el análisis de la valoración de la función cardíaca, puede ser útil para conocer más profundamente los procesos asociados con el deporte y el ejercicio intensivo.

**Palabras Clave:** inflamación, proteómica, fútbol, rendimiento físico

## INTRODUCCION

---

La práctica regular del ejercicio aeróbico moderado está asociada a la disminución del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Shephard y Balady, 1999). Los jugadores de fútbol profesionales invierten un período desigual de tiempo antes de la temporada para mejorar la capacidad física. Se ha comprobado que la intervención del entrenamiento intensivo para mejorar el rendimiento cardiaco, y por lo tanto el rendimiento aeróbico, es positiva en el rendimiento del fútbol con respecto a la distancia cubierta, los contactos con el balón y la cantidad de esprints realizados durante el partido (Hoff, 2005). De hecho, los deportistas sometidos a los más altos niveles de estrés físico son los jugadores de fútbol (Robson-Ansley et al., 2009). Varios estudios han reportado que el ejercicio intensivo afecta el sistema inmunológico, induce a la síntesis de las especies reactivas del oxígeno e incrementa la concentración plasmática de la citoquina pro-inflamatoria tal como la interleuquina-1 y -6 (IL-1, IL-6) y los reactantes de fase aguda relacionados con la inflamación (Boluyt et al., 2006; Guelfi et al., 2006; Moldoveanu et al., 2000; Petersen y Pedersen, 2005). Esta reacción inflamatoria aguda puede favorecer a una cantidad creciente de lesiones musculares, sobrecarga muscular y sensación de fatiga que podría reducir el rendimiento físico óptimo de los jugadores de fútbol (Robson-Ansley et al., 2009; Lequesne et al., 1997). Aunque se ha desarrollado una gran cantidad de investigaciones para analizar el efecto del ejercicio agudo sobre la inflamación como también si el ejercicio regular puede modificar la respuesta inflamatoria asociada a la enfermedad, aún se sabe poco sobre el efecto del entrenamiento regular en los deportistas en buen estado de salud sobre la expresión sistémica de los biomarcadores relacionados con la inflamación (Kim et al., 2009; Markovitch et al., 2008, Woods et al., 2009).

Hasta ahora, ha sido difícil monitorear los cambios en varias proteínas al mismo tiempo en una única muestra de plasma. En los últimos años, ha surgido una tecnología denominada proteometría, basada en la utilización de dos electroforesis bidimensionales (2-DE) y el análisis de espectrometría de masas. La proteometría proporciona una metodología útil para cuantificar e identificar cambios en el contenido de las proteínas múltiples y los isotipos de proteínas, que pueden ser útiles para comprender los mecanismos moleculares involucrados en varios procesos, incluyendo los cambios inducidos por el ejercicio en el contenido de las proteínas circulantes. Por lo tanto, la presente hipótesis ha sido que un programa de entrenamiento de pre-temporada puede modificar la respuesta inflamatoria sistémica en los jugadores de fútbol profesionales y que este perfil proteico e inflamatorio puede asociarse con el estado físico de los atletas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio ha sido comparar los biomarcadores de las proteínas plasmáticas, utilizando la proteometría, de los jugadores de fútbol profesionales después de un programa de entrenamiento de pre-temporada con respecto a los jugadores de fútbol recreacionales,

## METODOS

---

### **Población de Estudio**

En el presente estudio se incluyeron 12 jugadores de fútbol profesionales ( $25 \pm 4$  años) de la primera liga de fútbol español, que han participado del programa de entrenamiento de pre-temporada, y 9 individuos combinados por sexo y edad ( $26 \pm 3$  años), que no participaban de un entrenamiento de ejercicios regular y solo practicaban ejercicios durante 3-4 horas/semana. El programa de entrenamiento de pre-temporada de los jugadores de fútbol profesionales consistió de 20 horas/semana durante 3-4 semanas de entrenamiento regular de moderado a fuerte. El criterio de exclusión incluía la presencia de una enfermedad inflamatoria aguda o crónica, infección o lesión y la utilización de medicación anti-inflamatoria o suplementación que contuviera hierro. Con respecto a esto, hasta la fecha en que se recopilaron las muestras de sangre, los jugadores de fútbol profesionales, como también los jugadores de fútbol recreacionales, no tomaron ninguna otra suplementación nutricional como antioxidantes y vitaminas.

Las muestras de sangre para ambos grupos experimentales se obtuvieron durante el período de descanso, de 8:30 a 9:30, mediante venopuntura periférica. El plasma se obtuvo por centrifugación y las muestras se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizó el análisis proteómico. Este trabajo está incluido dentro de un estudio genético para analizar alteraciones genéticas asociadas con la enfermedad cardiovascular, que ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos. Todos los pacientes han dado su consentimiento informado.

### **Parámetros Fisiológicos**

A fin de evaluar el estado funcional físico, se utilizó el sistema Omegawave (Omegawave Technologies Portland, OR, EUA). El sistema de tecnología deportiva Omegawave es un método no-invasivo para evaluar varios parámetros fisiológicos en los atletas, incluyendo la variabilidad de la frecuencia cardiaca, la capacidad aeróbica y anaeróbica. El sistema Omegawave se

basa en la medición de la variabilidad de la frecuencia cardiaca (HRV), que es una evaluación validada de los parámetros cardíacos autónomos, comparable con el monitoreo estándar de 24 horas (Berkoff et al., 2007; Sánchez et al., 2009). Los dispositivos Omegawave consisten de un programa. La computadora se conecta a las sondas de ECG. Los datos se recopilaron durante 2.5 minutos. La señal digitalizada se filtró de acuerdo a los estándares comunes para lectura de ECG. Los intervalos R-R se identificaron y midieron en milisegundos (MS) con una precisión de  $\pm 2$  ms. A todos los sujetos se los evaluó mientras estaban recostados en posición supina sobre una mesa acolchada y se les permitió que descansaran durante un periodo de hasta 5 minutos, hasta que alcanzaran una frecuencia cardiaca de descanso. Los datos se recopilaron por la mañana temprano (entre las 8 a.m. y 9 a.m.).

### **Análisis Proteómico**

Para una electroforesis 2-dimensional, se diluyeron 500  $\mu\text{g}$  de proteínas plasmáticas en un amortiguador que contenía 8  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de urea, 2% CHAPS (wt/vol), 40  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ditiotreitól, 0.2% de ampólito Bio-Lyte (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) y 0,01 % (wt/vol) de azul de bromofenól. Las muestras se colocaron sobre tiras de gel con >gradiente de pH inmovilizado (pH 4 a 7), y el enfoque isoelectrico se llevó a cabo utilizando un sistema de células Protean IEF (Bio-Rad Labs). Como se reportó con anterioridad (Alonso-Orgaz et al., 2006; López-Farré et al., 2007), los geles se re-hidrataron de manera activa a 50 V durante 60 horas, seguido de pasos rápidos y lineales de voltaje de desnivel limitados por una corriente máxima de 50 mA por gel. En la segunda dimensión, las proteínas de las tiras se disolvieron en un 10% de geles de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio utilizando un sistema Protean II XL (Bio-Rad Labs). Después, los geles se fijaron y tiñeron de plata utilizando el kit de tinción de plata Protein PlusOne™ (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante.

### **Análisis de Adquisición de Imágenes**

Como se reportó anteriormente (Sacristán et al., 2008), los geles de tinción se escanearon en un escáner Umax Powerlook III operado por el programa Magic San V 4.5. La calibración de la intensidad se realizó utilizando una intensidad de escala de grises previa a la captura de la imagen de gel. El análisis de la imagen se realizó utilizando el programa Quantity One 4.2.3 (Bio-Rad). Los puntos de la imagen inicialmente se detectaron, se unieron y luego, se editaron de forma manual. El volumen de intensidad de cada punto se procesó mediante la sustracción del fondo.

### **Espectrometría de Masas (MS)**

Como se reportó en trabajos previos (Mateos-Cáceres et al., 2004; Sacristán et al., 2008), los puntos de interés se eliminaron de manera manual de los geles utilizando grupos de biopsias. En resumen, para la identificación de cada punto, se obtuvieron y se analizaron los puntos de tres geles diferentes después de la digestión de la tripsina. Luego, se purificaron los péptidos utilizando puntas C18 Zip-tips (Millipore). El análisis de la MS se llevó a cabo con 1  $\mu\text{l}$  de extractos purificados mezclados con 1  $\mu\text{l}$  de matriz de  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-trans cinámico (Sigma) en 50% acetonitrilo y la mezcla (1  $\mu\text{l}$ ) se observó sobre una placa MALDI. Como se reportó (Mateos-Cáceres et al., 2004; Sacristán et al., 2008), los análisis de la MS se realizaron en un analizador 4700 Proteomic Analyzer (Applied Biosystem), que operó en modo reflector positivo. Todos los espectros de la masa se calibraron utilizando una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystem). Los péptidos con una señal ruido mayor a 20 se tuvieron en cuenta en la base de datos Mascot para identificar proteínas. Como se reportó (Mateos-Cáceres et al., 2004; Sacristán et al., 2008; Mateos-Cáceres et al., 2010), la base de datos Mascot 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) se utilizó como algoritmo para combinar los péptidos obtenidos de la MS. Las identificaciones se aceptaron en base a una evaluación tripartita que tuvo en cuenta los resultados significativos de peso molecular de búsqueda (Mowse), la notación espectral y la migración observada contra la esperada sobre el gel 2-DE.

### **Determinaciones de la Interleuquina-6 (IL-6) y la Molécula Soluble de Adhesión Intercelular-1 (sICAM-1)**

La interleuquina-6 (IL-6) y la molécula soluble de adhesión intercelular-1 (sICAM-1) se midieron en el plasma sistémico mediante los kits de ensayos inmuno-absorbentes ligados a enzimas (ELISA). Los kits ELISA se compraron en Bender Med Systems (Vienna, Austria) para la sICAM-1 y en Sistemas R&D [Minneapolis, EU] para la IL-6. La sensibilidad de los ELISAs fueron de 2.2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para la sICAM-1 y de 0.70  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para la IL-6. Se realizaron análisis por duplicado para cada muestra, y se utilizó el promedio aritmético para el análisis de los datos.

### **Análisis Estadísticos**

Los resultados están expresados como medias  $\pm$  desviación estándar. Para determinar las diferencias estadísticas entre ambos grupos se utilizó el test de Mann-Whitney. Para las correlaciones se realizó el análisis de Spearman. A un valor de  $p < 0.05$  se lo consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### Estado Físico Funcional

En los dos grupos estudiados se analizaron los siguientes parámetros fisiológicos: la variabilidad cardíaca de alta frecuencia (HF), la variabilidad cardíaca de baja frecuencia (LF), la relación entre la alta frecuencia y la baja frecuencia (HF/LF), el índice de tensión y el consumo máximo de oxígeno ( $VO_2$ máx), la desviación estándar de los intervalos NN (SDSD) y la raíz cuadrada de las diferencias promedio al cuadrado de los sucesivos intervalos NN (RMSSD). Como se muestra en la Tabla 1, la LF fue significativamente menor en los jugadores de fútbol profesionales con respecto a los recreacionales. No se hallaron diferencias estadísticas en ninguno de los otros parámetros fisiológicos registrados entre los jugadores de fútbol profesionales y los recreacionales (Tabla 1).

Parámetro	Jugadores de fútbol recreacionales	Jugadores de fútbol profesionales
LF/HF	1.72 (.37)	1.32 (.44)
HF ( $ms^{-2}$ )	473.1 (84.4)	571.1 (190.6)
LF ( $ms^{-2}$ )	745.5 (107.6)	317.0 (84.4)*
$VO_2$ máx ( $ml \cdot Kg^{-1} \cdot min^{-1}$ )	57.3 (1.0)	53.5 (1.2)
Índice de tensión	75.8 (12.0)	102.8 (17.2)
SDSD (ms)	62.9 (6.6)	77.3 (15.8)
RMSSD (ms)	49.9 (5.5)	59.7 (12.1)

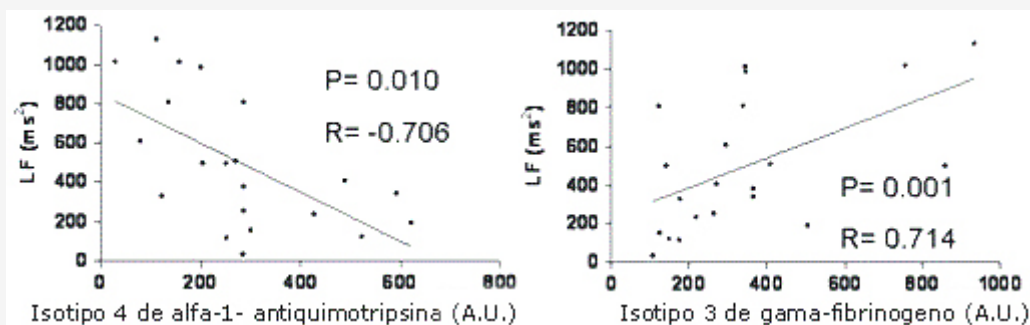
**Tabla 1.** Parámetros fisiológicos. Los valores están representados como medias ( $\pm$  error de desviación estándar). Abreviaturas: variabilidad cardíaca de alta frecuencia (HF), variabilidad cardíaca de baja frecuencia (LF), relación alta frecuencia/baja frecuencia (HF/LF), índice de tensión, consumo máximo de oxígeno ( $VO_2$ máx), desviación estándar de los intervalos NN (SDSD) y raíz cuadrada de las diferencias promedio al cuadrado de los sucesivos intervalos NN (RMSSD). \* $p < 0.05$

### Análisis Proteómico

En el análisis proteómico, todos los puntos identificados se expresaron al menos en el 65% de los geles 2-DE dentro de cada uno de los dos grupos de pacientes. En los geles 2-DE se identificaron y cuantificaron las siguientes proteínas: isotipos 1 a 6 de alfa-1-antitripsina, fetoproteína, tres isotipos de cadena gama-fibrinogeno, tres isotipos de proteína de unión a vitamina D, cinco isotipos de alfa 1-antiquimotripsina, seis isotipos de haptoglobina, seis isotipos de serotransferrina, tropomiosina (Tabla 2). En trabajos anteriores la identificación de las proteínas mencionadas anteriormente se identificaron mediante la espectrometría de masas.

PROTEINA	Jugadores de fútbol recreacionales [A.U.]	Jugadores de fútbol profesionales [A.U.]
<b>Albumina</b>		
Alfa-1-antitripsina	16702 (3506)	8509 (2324)
Isotipo 1	542 (196)	306 (85)
Isotipo 2	288 (89)	336 (62)
Isotipo 3	1027 (249)	315 (54)*
Isotipo 4	747 (237)	561 (182)
Isotipo 5	266 (77)	327 (93)
Isotipo 6	207 (52)	552 (125)*
Fetoproteína	134 (22)	220 (32)
<b>Cadena gama-fibrinógeno</b>		
Isotipo 1	557 (121)	203 (44)*
Isotipo 2	724 (221)	250 (40)*
Isotipo 3	494 (110)	236 (36)*
<b>Proteína de unión a vitamina D</b>		
Isotipo 1	683 (274)	103 (20)*
Isotipo 2	235 (102)	236 (59)
Isotipo 3	219 (71)	42 (6)
<b>Alfa 1-Antiquimotripsina</b>		
Isotipo 1	65 (26)	227 (52)*
Isotipo 2	241 (62)	398 (99)
Isotipo 3	249 (44)	428 (85)
Isotipo 4	121 (28)	376 (65)*
Isotipo 5	72 (13)	130 (23)
<b>Haptoglobina</b>		
Isotipo 1	403 (125)	905 (221)
Isotipo 2	356 (93)	446 (193)
Isotipo 3	433 (87)	507 (159)
Isotipo 4	624 (263)	550 (136)
Isotipo 5	366 (95)	520 (80)
Isotipo 6	173 (74)	221 (42)
<b>Serotransferrina</b>		
Isotipo 1	480 (61)	413 (68)
Isotipo 2	1233 (290)	1131 (240)
Isotipo 3	954 (165)	997 (201)
Isotipo 4	812 (58)	606 (109)
Isotipo 5	557 (91)	441 (131)
Tropomiosina	328 (99)	195 (41)

**Tabla 2.** Resultados de las isoformas de proteína plasmática analizadas utilizando la proteómica. Los datos son medias ( $\pm$  error estándar). A.U. unidades arbitrarias de densitometría.\*  $p < 0.05$ .



**Figura 1.** Diagrama de dispersión que muestra la relación entre la variabilidad cardíaca de baja frecuencia y los niveles plasmáticos

En estos trabajos previos publicados se mostraron las características de la espectrometría de masas de las proteínas plasmáticas identificadas y los isotipos de proteínas (Mateos-Cáceres et al., 2004; Sacristán et al., 2008). El plasma de los jugadores de fútbol profesionales mostró un contenido proteico menor del isotipo 3 de alfa-1-antitripsina (ATT-1), los isotipos 1, 2 y 3 de la cadena gama-fibrinogeno y el isotipo 1 de proteína de unión vitamina D, con respecto a los observados en el plasma de los jugadores de fútbol recreacionales (Tabla 2). Además, se halló un contenido plasmático significativamente más elevado del isotipo 6 de alfa-1-antitripsina y los isotipos 1 y 4 de alfa 1-antitripsina en el plasma de los jugadores de fútbol profesionales, con respecto a los del grupo recreacional (Tabla 2).

No se hallaron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales en el contenido de fetotropina de las proteínas plasmáticas, los seis isotipos de haptoglobina, los isotipos 1, 2, 3, 5 de serotransferrina y tropomiosina (Tabla 2).

### Niveles Plasmáticos Circulantes de Interleuquina-6 y de Molécula Soluble de Adhesión Intercelular-1

Los niveles plasmáticos de las proteínas pro-inflamatorias IL-6 y sICAM-1 se midieron en ambos grupos de jugadores de fútbol. No se hallaron diferencias estadísticas en los niveles plasmáticos circulantes de la IL-6 y la sICAM-1 entre los jugadores de fútbol profesionales y los recreacionales (Tabla 3).

PROTEINA	Jugadores de fútbol recreacionales	Jugadores de fútbol profesionales
IL-6 (pg·mL <sup>-1</sup> )	1.10 (0.96)	1.58 (0.27)
ICAM-1 (pg·mL <sup>-1</sup> )	36.8 (3.6)	35.8 (4.6)

**Tabla 3.** Niveles plasmáticos circulantes de interleuquina-6 (IL-6) y de molécula soluble de adhesión intercelular-1 (sICAM-1). Los datos son medias ( $\pm$  error estándar).

### Relación entre los Cambios en el Contenido de Proteínas Plasmáticas y el Estado Físico Funcional

Se analizó la relación entre el contenido de las proteínas plasmáticas y el estado funcional físico de los jugadores de fútbol. El análisis de Spearman mostró una correlación positiva entre la LF y el isotipo 3 de la cadena gama del fibrinogeno (Figura 1). La LF mostró una correlación negativa y significativa entre el contenido plasmático del isotipo 4 de alfa-antitripsina y la LF (Figura 1).

## DISCUSION

El presente estudio comparó el contenido plasmático de las proteínas asociadas a la inflamación, utilizando la proteometría, y el estado fisiológico, utilizando el sistema Omegawave, en los jugadores de fútbol profesionales, después de un programa de entrenamiento intensivo y antes de comenzar la liga. Como grupo comparativo se utilizó un grupo de jugadores que practican fútbol los fines de semana. A los jugadores de fútbol profesionales no se los sometió a ningún programa de entrenamiento específico antes de la competencia.

En el mapa proteómico plasmático se identificaron seis isotipos de ATT-1. Se halló un isotipo 6 de ATT-1 incrementado, pero el isotipo 3 de ATT-1 disminuyó en los jugadores de fútbol profesionales, en comparación con los de los jugadores recreacionales. La ATT-1 es un inhibidor poderoso de varias proteínas proteolíticas, principalmente liberado de neutrófilos, y está involucrado en la resolución de la respuesta inflamatoria (Brantly, 2002). Los estudios han demostrado que el nivel de ATT-1 aumentó después del ejercicio, probablemente para compensar la mayor producción de elastasa de neutrófilos, que inhibe de manera indirecta la activación complementaria inducida durante y/o después del ejercicio (Dufaux et al., 1991; Petibois et al., 2003; Semple et al., 2006). Por lo tanto, el ejercicio intensivo y prolongado puede favorecer a los cambios en el contenido sistémico de isotipos específicos de ATT-1. En este aspecto, no se ha establecido la función para cada isotipo ATT-1, a algunos genotipos de ATT-1 se los ha asociado con el riesgo reducido de enfermedades cerebrovasculares isquémicas y cardíacas (Talmud y Stephens, 2004) e incluso con la enfermedad cardiovascular aguda (Mateos-Cáceres et al., 2004). Los jugadores de fútbol profesionales mostraron un nivel plasmático incrementado de los isotipos 1 y

4 de alfa 1-antiquimotripsina. El alfa 1-antiquimotripsina es un factor anti-inflamatorio cuya función es la de inhibir las serín proteasas (Kalsheker et al., 2002). Los trabajos realizados en pacientes con enfermedades cardiovasculares han demostrado una reducción de las proteínas relacionadas con la inflamación luego de un entrenamiento de resistencia supervisado (Niessner et al., 2006). El hecho de que el entrenamiento de resistencia incrementó el nivel plasmático de las proteínas anti-inflamatorias asociadas, tales como los isotipos 1 y 4 de la antiquimotripsina, puede sugerir que el ejercicio regular redujo la inflamación. Sin embargo, en el presente estudio, los niveles plasmáticos circulantes de dos biomarcadores pro-inflamatorios, concretamente la IL-6 y la sI-CAM-1, no fueron modificados en los jugadores de fútbol profesionales con respecto a los recreacionales. Por lo tanto, el hecho de que el contenido plasmático de los isotipos de antiquimotripsina aumentó en los jugadores de fútbol profesionales después del programa de entrenamiento de pre-temporada podría sugerir que el entrenamiento regular favorece a un estado anti-inflamatorio sin modificaciones en la síntesis de los agentes pro-inflamatorios. Los niveles de alfa 1-antiquimotripsina también se han asociado al control del daño oxidativo (Licastro et al., 2001). De hecho, un partido de fútbol aumenta los niveles de estrés oxidativo y el daño muscular a lo largo del período de recuperación (Ascensão et al., 2008; Volvaard et al., 2005). Por lo tanto, el mecanismo protector contra el daño oxidativo como un nivel de antiquimotripsina plasmática puede estar favorecido por el ejercicio regular.

El análisis proteómico también reveló una disminución en el contenido de los isotipos 1, 2 y 3 de la cadena gama del fibrinogeno en los jugadores de fútbol profesionales con respecto a los del grupo recreacional. El fibrinógeno es una glucoproteína incluida en un agregado plaquetario, dado que aumenta la unión plaquetaria, de las células endoteliales y de los leucocitos entre ellos (Bombeli et al., 1998; Fibrinogen Studies Collaboration et al., 2007). Estos hallazgos pueden concordar con observaciones previas de que el entrenamiento de intensidad moderada reduce la reactividad plaquetaria y mejora la fibrinólisis en el descanso (Wang, 2006). Sin embargo, algunos autores también han reportado que estos efectos favorables del entrenamiento regular en estado trombotico regresa a un estado de pre-entrenamiento luego de un período de desacondicionamiento (Wang, 2006).

El isotopo 1 de DBP fue significativamente menor en los jugadores de fútbol profesionales con respecto a los del grupo recreacional. La DBP es una globulina alfa-2 sérica que une a la vitamina D (Gomme y Bertolini, 2004). Además, a la DBP también se la ha descrito como activadora de los leucocitos (Zhang y Kew, 2004) y contribuye al secuestro de actina, la estimulación de la actividad osteoclástica, el transporte de ácidos grasos y también inhibe el agregado plaquetario inducido por la actina (Meier et al., 2006; Speckaert et al., 2006). Por lo tanto, la disminución del contenido del isotipo 1 de DBP, reportada en el presente en los jugadores de fútbol profesionales, también puede estar asociada al estado anti-trombotico que parece estar relacionado con el entrenamiento intensivo (Wang et al., 2006).

### **Relación entre los Cambios en el Contenido de Proteínas Plasmáticas y el Estado Físico Funcional**

Se observó un incremento no significativo en el  $VO_2$ max, la variabilidad cardíaca de alta frecuencia, la SDSD, la RMSSD y el índice de tensión; y una disminución estadística significativa de la variabilidad cardíaca de baja frecuencia en los jugadores de fútbol profesionales en comparación con el grupo de control. Estudios previos han reportado que el entrenamiento aeróbico equilibra la modulación del vago que se refleja en los parámetros de variabilidad de la frecuencia cardíaca tal como una disminución en las porciones de baja frecuencia (Hautala et al., 2009). La variabilidad individual en los parámetros fisiológicos determinados es probable que pueda explicar porqué no se hallaron diferencias estadísticas entre los dos grupos experimentales.

Una vez analizada toda la población de estudio, se halló una asociación negativa entre la variabilidad cardíaca de baja frecuencia y el contenido plasmático del isotipo 4 de alfa-1 antiquimotripsina, y una asociación positiva entre la variabilidad cardíaca de baja frecuencia y el isotipo 3 de la cadena gama del fibrinogeno. Los presentes resultados sugieren que el estado funcional cardiaco de los jugadores de fútbol puede guardar relación con estas proteínas. No obstante, el hecho de que algunas proteínas, cuyo contenido plasmático entre los jugadores profesionales y recreacionales cambió, no guarde relación con la variabilidad cardíaca de baja frecuencia, sugiere que su contenido plasmático no era dependiente de los factores hemodinámicos. En este aspecto, se ha establecido que el contenido de muchas proteínas podría estar regulado por el estrés vascular de corte. Se ha demostrado que el estrés vascular de corte aumentó con el ejercicio físico, particularmente el estrés de corte afecta la expresión del gen en la endotelina (Niebauer y Cooke, 1996).

## **CONCLUSION**

En conclusión, el estudio proteómico ha demostrado diferencias en el contenido de las proteínas plasmáticas asociadas al estrés inflamatorio/oxidativo y la trombosis entre los jugadores de fútbol profesionales y recreacionales. En particular, los jugadores de fútbol profesionales mostraron un menor contenido de proteínas circulantes asociadas con la inflamación, en

comparación con el de los jugadores de fútbol recreacionales. Además, estos datos sugieren que el análisis de proteómica, en combinación con el análisis de la evaluación de la función cardiaca, puede ser útil para conocer más profundamente los procesos inflamatorio molecular y oxidativo asociados con el deporte.

## Puntos Clave

- La proteómica permite hallar diferencias en el contenido de las proteínas plasmáticas de los deportistas.
- Inmediatamente después del programa de entrenamiento de pre-temporada, los jugadores de fútbol profesionales mostraron un contenido menor de proteínas circulantes asociadas a la inflamación, en comparación con los jugadores de fútbol recreacionales.
- El análisis de proteómica, en combinación con el análisis de la función cardiaca, puede ser útil para conocer más profundamente los procesos inflamatorio molecular y oxidativo asociados con el deporte.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social (Redes temáticas de Cooperación Red Heracles RD06/0009/010). Petra J. Mateos-Cáceres es miembro de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos. José J Zamorano-León es un miembro apoyado por Red Heracles. Los autores agradecen la colaboración del Centro de Investigación Científica (*Science Research Center*) de la Fundación Atlético de Madrid (*Atlético de Madrid Foundation*) y a Begoña Larrea y Miguel Dantart por su asistencia editorial.

## REFERENCIAS

1. Berkoff, D.J., Cairns, C.B., Sanchez, L.D. and Moorman, C.T. 3rd (2007). Heart rate variability in elite American track-and-field athletes. *Journal of Strength Conditioning Research* 21, 227-231
2. Boluyt, M.O., Brevick, J.L., Rogers, D.S., Randall, M.J., Scalia, A.F. and Li, Z.B (2006). Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics* 6, 3154-3169
3. Bombeli, T., Schwartz, B.R. and Harlan, J.M (1998). Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta1 integrin, and GPIIb/IIIa. *Journal Experimental Medicine* 187, 329-339
4. Brantly, M (2002). Alpha1-antitrypsin: not just an antiprotease: extending the half-life of a natural anti-inflammatory molecule by conjugation with polyethylene glycol. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology* 27, 652-654
5. Dufaux, B., Order, U. and Liesen, H (1991). Effect of a short maximal physical exercise on coagulation, fibrinolysis, and complement system. *International Journal of Sports Medicine* 12(Suppl 1), S38-42
6. Fibrinogen Studies Collaboration, Kaptoge, S., White, I.R., Thompson, S.G., Wood, A.M., Lewington, S., Lowe, G.D. and Danesh, J (2007). Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies. *American Journal Epidemiology* 166, 867-879
7. Gomme, P.T. and Bertolini, J (2004). Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends Biotechnology* 22, 340-345
8. Guelfi, K.J., Casey, T.M., Giles, J.J., Fournier, P.A. and Arthur, P.G (2006). A proteomic analysis of the acute effects of high-intensity exercise on skeletal muscle proteins in fasted rats. *Clinical and Experimental Pharmacology Physiology* 33, 952-957
9. Hautala, A.J., Kiviniemi, A.M. and Tulppo, M.P (2009). Individual responses to aerobic exercise: the role of the autonomic nervous system. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 33, 107-115
10. Hoff, J (2005). Training and testing physical capacities for elite soccer players. *Sports Science* 23, 573-582
11. Kalsheker, N., Morley, S. and Morgan, K (2002). Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochemical Society Transactions* 30, 93-98
12. Kim, H.J., Lee, Y.H. and Kim, C.K (2009). Changes in serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP), plasma CPK and plasma hs-CRP in relation to running distance in a marathon (42195 km) and a ultra-marathon (200 km) race. *European Journal of Applied Physiology* 105, 765-770
13. Lequesne, M.G., Dang, N. and Lane, N.E (1997). Joint practice and osteoarthritis of the limbs. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 75-86
14. Licastro, F., Pedrini, S., Davis, L.J., Caputo, L., Tagliabue, J., Savorani, G., Cucinotta, D. and Annoni, G (2001). Alpha-1-antichymotrypsin and oxidative stress in the peripheral blood from patients with probable Alzheimer disease: a short-term longitudinal study. *Alzheimer Disease Association Disorder* 15, 51-55
15. Markovitch, D., Tyrrell, R.M. and Thompson, D (2008). Acute moderate-intensity exercise in middle-aged men has neither an anti- nor proinflammatory effect. *Journal Applied Physiology* 105, 260-265
16. Meier, U., Gressner, O., Lammert, F. and Gressner, A.M (2006). Gc-globulin: roles in response to injury. *Clin Chem* 52, 1247-1253



17. Moldoveanu, A.I., Shephard, R.J. and Shek, P.N (2000). Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *Journal Applied Physiology*, 89, 1499-1504
18. Niebauer, J. and Cooke, J.P (1996). Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *Journal American College Cardiology* 28, 1652-1660
19. Niessner, A., Richter, B., Penka, M., Steiner, S., Strasser, B., Ziegler, S., Heeb-Elze, E., Zorn, G., Leitner-Heinschink, A., Niessner, C., Wojta, J. and Huber, K (2006). Endurance training reduces circulating inflammatory markers in persons at risk of coronary events: impact on plaque stabilization? . *Atherosclerosis* 186, 160-165
20. Petersen, A.M. and Pedersen, B.K (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal Applied Physiology* 98, 1154-1162
21. Robson-Ansley, P., Barwood, M., Canavan, J., Hack, S., Eglin, C., Davey, S., Hewitt, J., Hull, J. and Ansley, L (2009). The effect of repeated endurance exercise on IL-6 and sIL-6R and their re-relationship with sensations of fatigue at rest. *Cytokine* 45, 111-116
22. Semple, S.J., Smith, L.L., McKune, A.J., Hoyos, J., Mokgethwa, B., San Juan, A., Lucia, A. and Wadee, A.A (2006). Serum concentrations of C reactive protein, alpha1 antitrypsin, and complement (C3, C4, C1 esterase inhibitor) before and during the Vuelta a España. *British Journal Sports Medicine* 40, 124-127
23. Shephard, R.J. and Balady, G.J (1999). Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation* 99, 963-972
24. Speeckaert, M., Huang, G., Delanghe, J.R. and Taes, Y.E (2006). Bio-logical and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clinica Chimica Acta* 372, 33-42
25. Talmud, P.J. and Stephens, J.W (2004). Lipoprotein lipase gene variants and the effect of environmental factors on cardiovascular disease risk. *Diabetes Obesity Metabolism* 6, 1-7
26. Vollaard, N.B., Shearman, J.P. and Cooper, C.E (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Medicine* 35, 1045-1062
27. Wang, J.S (2006). Exercise prescription and thrombogenesis. *Journal Biomedicine Science* 13, 753-761
28. Woods, J.A., Vieira, V.J. and Keylock, K.T (2009). Exercise, inflammation, and innate immunity. *Immunology Allergy Clinics North America* 29, 381-393
29. Zhang, J. and Kew, R.R (2004). Identification of a region in the vitamin D-binding protein that mediates its C5a chemotactic cofactor function. *Journal Biological Chemistry* 279, 53282-53287

### **Cita Original**

Francisco J. Martín-Sánchez, José María Villalón, José J. Zamorano-León, Luis Fernández Rosas, Ricardo Proietti, Petra J. Mateos-Caceres, Juan J. González-Armengol, Pedro Villarroel, Carlos Macaya and Antonio J. López-Farré. Functional Status and Inflammation after Preseason Training Program in Professional and Recreational Soccer Players: A Proteomic Approach. *Journal of Sports Science and Medicine* (2011) 10, 45 - 51