



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Efecto de ejercicio físico en el estado redox del sistema respiratorio

Felipe Andrés Contreras Briceño



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

TESIS DOCTORAL

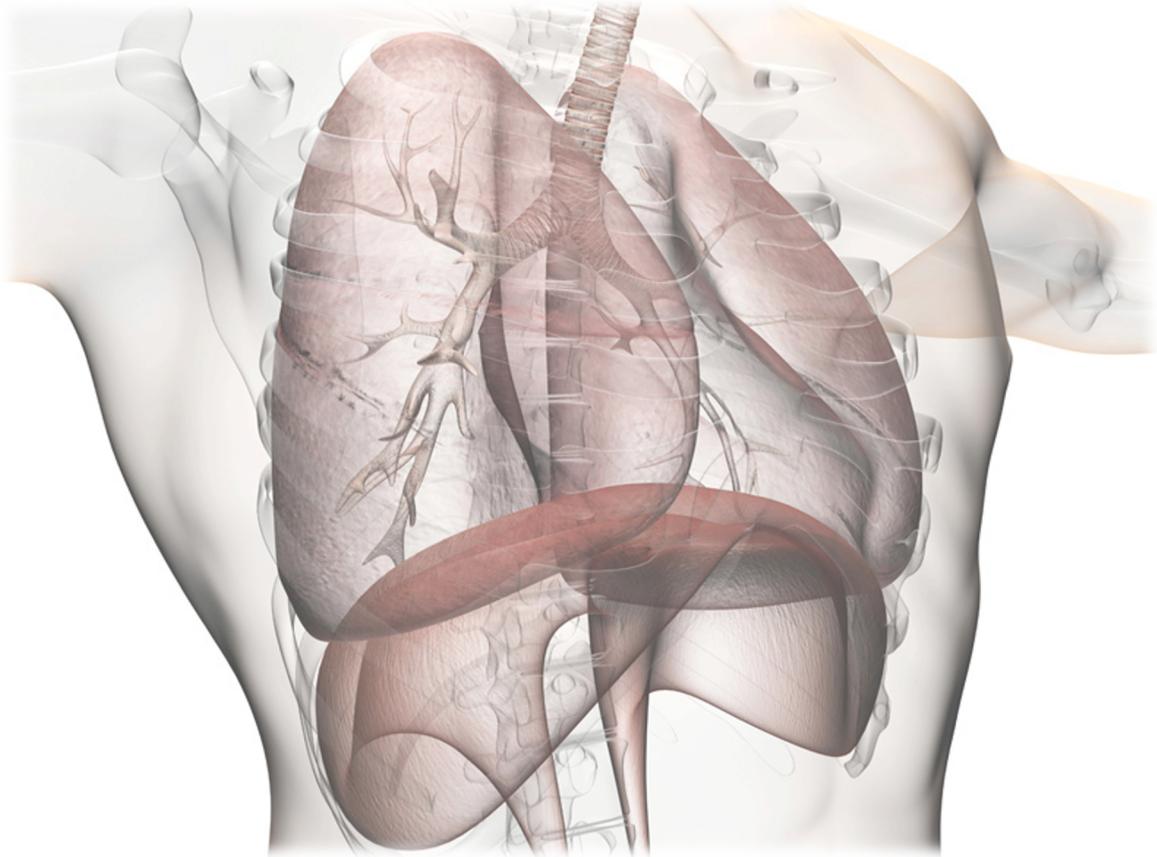
EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO EN EL ESTADO REDOX DEL SISTEMA RESPIRATORIO

Una mirada al impacto del ejercicio físico sobre el sistema respiratorio y rendimiento deportivo.

¿Se altera el estado redox en deportistas crónicamente expuestos a irritantes respiratorios al desarrollar ejercicio físico?

¿Serán las condiciones ambientales las responsables de los cambios respiratorios?

De existir cambios en el estado redox, ¿Se altera el rendimiento físico en deportistas ?



Felipe Andrés Contreras Briceño

Programa de Doctorado en Biomedicina

2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Sección de Fisiología

Memoria presentada por **Felipe Andrés Contreras Briceño**, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona, por el programa de Doctorado en Biomedicina.

La presente tesis doctoral, “Efecto de ejercicio físico en el estado redox del sistema respiratorio” ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Ginés Viscor Carrasco y del Dr. Oscar Araneda Valenzuela y tutorizada por el Dr. Ginés Viscor Carrasco.

Esta tesis se encuentra adscrita a la línea de investigación de Metabolismo, Señalización metabólica y Patologías asociadas del programa de Doctorado en Biomedicina de la Universidad de Barcelona, y colaboró al grupo de Fisiología del Ejercicio e Hipoxia del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.

Dr. Ginés Viscor Carrasco
Director y Tutor

Dr. Oscar Araneda Valenzuela
Director

Felipe Contreras Briceño

Barcelona

2020

“El poeta no cumple su palabra si no cambia los nombres de las cosas”

-Nicanor Parra-

Agradecimientos

A mi esposa Giselle, quien me ha apoyado en todos los desafíos y sueños que he tenido durante mi formación profesional...gracias por todo el apoyo y paciencia durante tanto tiempo.

A mis hijos Matías, M^a Trinidad y Agustín, por toda la paciencia que en forma consciente o no han tenido en todos estos años en los que postergué momentos...aunque no lo crean, gran parte de este proyecto es por y para ustedes...los amo.

A mi padre Nelson y madre María, quienes se preocuparon de entregarme como herramientas de vida la constancia, disciplina y perseverancia...características esenciales para no declinar cuando aumenta la pendiente.

A mi hermana Patricia, por su apoyo y preocupación en aspectos relacionados a la toma de muestras. A mi hermano Diego, por su constante preocupación respecto al desarrollo de mi proceso formativo.

A Luis Pizarro, gracias por todo el apoyo en las mediciones de laboratorio, y sobretodo, por ser una caja de sorpresas...eres un conocedor de todo.

A todos los participantes de los estudios que comprenden esta tesis, gracias por su invaluable aporte voluntario para con la ciencia.

A los doctores Norma Alva, Joan Ramón Torrella, y Jesus Palomeque, miembros de la Comisión de Seguimiento de esta tesis, quienes con altruismo me entregaron retroalimentación valiosa durante las diferentes instancias de evaluación en mi proceso formativo del programa de doctorado.

A mis directores de tesis, los doctores Oscar Araneda y Ginés Viscor, gracias por permitirme formarme como investigador con ustedes, y por sobretodo, por la entrega desinteresada de valores académicos y experiencias de vida que me orientan y motivan a ser una mejor persona día a día...gracias por siempre.

Abstract

The prolonged and intense physical exercise affects the balance of the oxidation-reduction (redox) state of the respiratory system as a result of increased pulmonary ventilation ($\dot{V}E$), inhalation of irritants and particulate matter, hypoxia, and adverse environmental conditions such as cold and ambient dry, as these factors dehydrate the fluid that covers the respiratory epithelium, induce bronchoconstriction and inflammation of the airway, with the consequent more significant formation of reactive chemical species which, by overcoming local antioxidants, cause oxidative stress, and with this, damage of biomolecules and local cellular structures.

A non-invasive method that allows measuring at the respiratory level the concentration of some of these reactive species is the exhaled breath condensate (EBC). By this method, previous studies had been documented an increase in hydroperoxides (H_2O_2), nitrites (NO_2^-), malondialdehyde (MDA), and peroxynitrite ($ONNO\cdot$) in long-distance runners posterior at 21.1 and 42.2-km, and healthy untrained subjects after completed 10-km and 90 minutes of cycling. In these studies, the production of the respiratory reactive chemical species evaluated showed a direct correlation with the total lung ventilation achieved at physical exercise, concluding that either the intensity at which the efforts were completed and the respiratory adaptations induced previously by training were relevant factors related with changes of the respiratory redox state. An aspect poorly explored in this context is the influence of the environmental conditions where the exercise is carried out; as well as whether or not these molecular changes impacted on lung function and sports performance.

This thesis explored the topic mentioned previously; thus, the article I evaluated the influence of chlorine, as a respiratory irritant, on the production of $[H_2O_2]_{CAE}$, $[NO_2^-]_{CAE}$, $[NO_2^-]_{CAE}/[NO_2^-]_{Plasma}$, and lung function parameters (FEV_1 , $FEF_{25-75\%}$) after two different physical exercise protocols (3500-m indoor-swimming vs 10-km outdoor-running) in competitive swimmers. Contrary to the hypothesis, the respiratory reactive chemical species assessed increased after running and decreased after swimming, even with the presence of chlorine in the inhaled air. As the main discussion, it was held that the higher relative humidity present in swimming could have favoured this type of exercise. To elucidate this, the article II evaluated in recreational cyclists the influence of high relative humidity condition (90% vs 40%) on the production of the same respiratory reactive chemical species after 60 minutes of pedalling at 70% of the maximum load, and the impact on lung function. Interestingly, it was shown that high-relative humidity (90%) "protects" the alteration of the respiratory redox state to the increase in $\dot{V}E$ and promotes

bronchodilation even 80 minutes after exercise. In both articles, it was found that the respiratory species assessed showed a direct correlation with the total lung ventilation reached in the protocols of exercise used. As the $\dot{V}E$ is the result of the work of the inspiratory muscles during respiration (work of breathing, WOB), and for evaluating the effect of the WOB on the respiratory redox state, the article III evaluated the reliability of the local muscle oxygen saturation (SmO_2), measured by near-infrared spectroscopy (Near-Infrared Spectroscopy, NIRS) at intercostal muscles in marathon runners during the oxygen consumption test ($\dot{V}O_{2-max}$), showing good-to-excellent values at higher values of $\dot{V}E$.

The conclusion of studies carried out are: (i) swimmers chronically exposed to the respiratory irritant of chlorine and by-products, show respiratory redox alteration 24 hours after running 10-km and not swimming 3500-m; (ii) in recreational cyclists, high-relative humidity (90%) prevents the induced formation of respiratory reactive chemical species evaluated, and promote bronchodilation; and (iii) in marathon runners, the evaluation of muscle oxygen saturation at intercostal muscles using NIRS is a novel method that allows quantifying the work of breathing (WOB) for increasing the $\dot{V}E$ during exercise.

Índice

Agradecimientos	vi
<i>Abstract</i>	vi
Índice	viii
Listado de Figuras.....	x
Listado de Tablas.....	xi
Abreviaturas.....	1
1 Introducción general.....	4
1.1 Presentación de las publicaciones.....	4
1.2 Resumen.....	7
1.3 Especies reactivas (<i>Reactive Species</i> , RS).....	10
1.4 Antioxidantes.....	14
1.5 Daño por RS sobre biomoléculas.....	18
1.6 Ejercicio y fuentes de origen de RS en el sistema respiratorio.....	20
1.7 Técnicas de recolección de muestras respiratorias.....	27
1.8 RS y parámetros inflamatorios en muestras de CAE.....	28
1.9 Valoración del trabajo respiratorio (<i>work of breathing</i> , WOB).....	32
2 Objetivos.....	35
2.1 Objetivo 1 (Artículo científico 1).....	35
2.2 Objetivo 2 (Artículo científico 2).....	35
2.3 Objetivo 3 (Artículo científico 3).....	35
3 Informe de los directores.....	37
4 Publicaciones científicas.....	41
4.1 Artículo científico I.....	41
4.2 Artículo científico II.....	53
4.3 Artículo científico III.....	64
5 Discusión general.....	73
6 Conclusiones.....	84
7 Bibliografía.....	87
8 Apéndices.....	108
8.1 Acta de Aprobación Ética – Artículo 1.....	108
8.2 Acta de Aprobación Ética – Artículo 2.....	110
8.3 Acta de Aprobación Ética – Artículo 3.....	113
8.4 Presentación póster - 67 th <i>Annual Meeting</i> , ACSM.....	115
8.5 Presentación oral - 25 th <i>Annual Meeting</i> , ECSS.....	116

8.6	Presentación póster - 25 th <i>Annual Meeting, ECSS</i>	119
8.7	Otras publicaciones.	122

Listado de Figuras

Figura 1. Esquema de reacciones del glutatión.	17
Figura 2. Etapas de la oxidación de los lípidos.	19
Figura 3. Sitios de fuga de electrones y protones en la mitocondria.	22
Figura 4. Mecanismos de producción de especies reactivas por el complejo enzimático XO-XOD.	23
Figura 5. Composición de los complejos de enzimas NOX.	24
Figura 6. Factores que pueden activar NOX y aumentar las especies reactivas.	24
Figura 7. Mecanismos implicados en el daño oxidativo e inflamación pulmonar inducida por ejercicio.	25
Figura 8. Mecanismos implicados en la formación de especies reactivas respiratorias durante la natación.	76

Listado de Tablas

Tabla 1. Nomenclatura de especies reactivas.....	11
--	----

Abreviaturas

AE:	Aire espirado.
ATP:	Adenosín trifosfato.
CAE:	Condensado de aire espirado.
CAT:	Enzima catalasa.
Cl ₂ :	Cloro gaseoso.
EI:	Espujo inducido.
EPOC:	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
FC:	Frecuencia cardíaca.
Fe ²⁺ :	Ión ferroso.
Fe ³⁺ :	Ión férrico.
TNF-1 α :	Factor de necrosis tumoral 1-alfa.
Fr:	Frecuencia respiratoria.
GR:	Enzima glutatión reductasa.
GSH:	Glutatión reducido.
GSH-Px:	Enzima glutatión peroxidasa.
GSSG:	Glutatión oxidado.
GST:	Enzima glutatión transferasa.
GRx:	Glutaredoxina.
H ⁺ :	Catión de hidrógeno (protón).
HClO:	Acido hipocloroso.
HTA:	Hipertensión arterial.
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno.
IL:	Interleuquina.
LOO \cdot :	Radical peroxilipídico.
LTs:	Leucotrienos.
MDA:	Malondialdeido.
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa.
NADP:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada.
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida.
NF- $\kappa\beta$:	Factor nuclear kappa β .
NIRS:	<i>Near-Infrared Spectroscopy</i> (longitud de onda cercana al rango infrarrojo).
NO \cdot :	Oxido nítrico.

NO ₂ *:	Dióxido de nitrógeno.
NO ₂ :	Nitrito.
NO ₃ :	Nitrato.
NOS:	Enzima óxido nítrico sintasa.
NOX:	Enzimas NADPH oxidasas.
OH:	Radical hidroperoxilo.
¹ O ₂ :	Oxígeno singulete.
O ₂ :	Oxígeno molecular.
O ₂ *:	Anión superóxido
O ₃ :	Ozono.
OH:	Radical hidroxilo.
ONOO:	Peroxinitrito.
PCR:	Proteína C reactiva.
PGs:	Prostaglandinas.
PRx:	Peroxiredoxina.
RL:	Radical libre.
RNS:	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (especies reactivas de nitrógeno).
ROS:	<i>Reactive Oxygen Species</i> (especies reactivas de oxígeno).
RS:	<i>Reactive Species</i> (especies reactivas).
SmO ₂ :	Saturación muscular de oxígeno.
SOD:	Enzima superóxido dismutasa.
TBARs:	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> (s. reactivas del ácido tiobarbitúrico).
THb:	Hemoglobina total.
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alfa.
TRx:	Tioredoxina.
VE:	Ventilación pulmonar.
VO ₂ :	Consumo de oxígeno.
Vc:	Volumen corriente.
WOB:	<i>Work of breathing</i> (Trabajo o costo energético de la respiración sistémica).
XO:	Enzima xantino oxidasa.
XOD:	Enzima xantina oxidasa deshidrogenasa.
8-OHdG:	8-hidrodesoxiguanosina.

1. Introducción general

1 Introducción general.

1.1 Presentación de las publicaciones.

La presente tesis se compone de comunicaciones científicas (artículos científicos o *papers*) fruto del proceso de formación académica del programa de Doctorado en Biomedicina de la Universidad de Barcelona llevado a cabo durante los años 2016 a 2020, y desarrollados en el Grupo de Fisiología del Ejercicio e Hipoxia (Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología) de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (España) y el Grupo de Fisiología del Ejercicio (Departamento de Ciencias de la Salud) de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Chile)

Las investigaciones realizadas en este proceso se enmarcan en el proyecto denominado “Efecto del ejercicio físico en el estado redox del sistema respiratorio”, y dan cuenta de cambios en componentes químicos, mecánicos o asociados al costo energético, y de valoración funcional o pruebas clínicas del sistema respiratorio en deportistas producto del ejercicio físico en diferentes condiciones ambientales.

Los trabajos o comunicaciones científicas que conforman esta tesis son los siguientes:

Artículos científicos (en el transcurso de la tesis se hará referencia a esta numeración):

- I.** Araneda, OF; Contreras-Briceño, F; Cavada, G & Viscor, G.
Swimming versus running: effects on exhaled breath condensate pro-oxidants and pH.
European Journal of Applied Physiology. 2018;118 (11): 2319–2329.
- II.** Contreras-Briceño, F; Espinosa-Ramirez, M; Viscor, G & Araneda OF.
Humidity prevents the formation of exercise-induced hydrogen peroxide and nitrite in exhaled breath condensate in recreational cyclists.
European Journal of Applied Physiology. 2020; 120 (10): 2339–2348.
- III.** Contreras-Briceño, F; Espinosa-Ramirez, M; Hevia, G; Llambias, D; Carrasco, M; Cerda, F; López-Fuenzalida, A; García, P; Gabrielli, L & Viscor G.
Reliability of NIRS portable device for measuring intercostal muscles oxygenation during exercise.
Journal of Sports Sciences. 2019; 37 (23): 2653–2659.

En el artículo I se evaluó el efecto de dos protocolos de ejercicio físico intenso y prolongado sobre el estado redox respiratorio de nadadores competitivos, uno en presencia de irritantes respiratorios (cloro y sus bioderivados) y otro al aire libre, evaluado mediante el análisis de especies químicas reactivas (peróxido de hidrógeno (H_2O_2), nitrito (NO_2^-)) y pH en muestras de condensado de aire espirado (CAE) y plasma sanguíneo; y la función pulmonar, evaluada mediante la interpretación de los volúmenes y capacidades pulmonares a través de espirometría. Lo anterior, en virtud de que estas variables pueden verse afectadas dado la exposición crónica a irritantes respiratorios presentes en piscinas tratadas con cloro. Así, el objetivo del estudio fue comparar los cambios en el estado redox respiratorio y parámetros de espirometría en los participantes tras completar una natación de 3.500-m vs. correr 10-k, ambos desarrollados a alta intensidad. La conclusión fue que en sujetos crónicamente expuestos a irritantes respiratorios, el estado redox respiratorio se afecta más al correr que al nadar. La discusión de los resultados motivó el estudio aislado de una de las variables de la condición ambiental que posiblemente podría haber influenciado los resultados, aspecto que fundamentó el desarrollo de la siguiente investigación.

En el artículo II se evaluó la influencia de la humedad relativa sobre los cambios inducidos por ejercicio físico en el estado redox del sistema respiratorio en ciclistas recreativos. Esta investigación se desarrolló en condiciones controladas de laboratorio, con monitorización exhaustiva de variables que habitualmente participan en forma conjunta y son difíciles de aislar en condiciones reales cuando se desarrolla la actividad deportiva. Para llevar a cabo la investigación, fue necesario construir una cámara semi-hermética especial para mantener estables los niveles de humedad relativa, sin cambiar los valores de temperatura ambiental y así evitar que esta variable influenciara los resultados. Los deportistas desarrollaron un protocolo de ejercicio intenso y prolongado en dos condiciones distintas de humedad relativa (40% vs. 90%). Se analizaron muestras de CAE y plasma sanguíneo, más parámetros de función pulmonar (espirometría). Los resultados obtenidos dieron cuenta que la alta humedad relativa actuó como factor protector sobre el sistema respiratorio respecto al efecto pro-oxidante e inflamatorio del ejercicio físico, pues en condiciones de alta humedad relativa se minimizó la producción de H_2O_2 y NO_2^- en muestras de CAE, permaneciendo además la broncodilatación inducida por ejercicio incluso 80 minutos una vez finalizado el protocolo. Lo interesante es que estos efectos se lograron en el protocolo de ejercicio que alcanzó una mayor ventilación pulmonar (\dot{V}_E) por más tiempo, teniendo en consideración que este parámetro

en investigaciones previas se ha asociado a la mayor producción de especies químicas reactivas oxidantes en el sistema respiratorio.

En el artículo III se determinó la confiabilidad de la valoración de oxigenación en músculos respiratorios (*m. intercostales*) durante el ejercicio físico en deportistas entrenados en largas distancias (corredores de maratón), a través de la medición no invasiva de la saturación muscular de oxígeno (SmO_2) mediante el uso de dispositivos portátiles que interpretan la longitud de onda del rango cercano al infrarrojo (*Near-Infrared Spectroscopy*, NIRS). El motivo del desarrollo de esta investigación se basó en la necesidad de contar con un método objetivo que de cuenta del trabajo realizado por los músculos respiratorios (*work of breathing*, WOB) durante el ejercicio físico máximo en deportistas acostumbrados a alcanzar elevados valores de $\dot{V}E$, entendiendo que esta variable está asociada a la producción de especies químicas reactivas del sistema respiratorio, como lo muestran los resultados obtenidos en investigaciones previas. Los resultados mostraron una *good-to-excellent* confiabilidad de la medición de SmO_2 -*m.intercostales* en corredores competitivos de maratón durante la valoración de la máxima capacidad aeróbica o cardiovascular (prueba de consumo de oxígeno máximo, $\dot{V}O_{2\text{-máx}}$). Como resultado interesante, se encontró una correlación positiva entre SmO_2 -*m.intercostales* con la ventilación minuto. Ahora bien, queda pendiente evaluar si el WOB desarrollado en el ejercicio se asocia con la alteración del estado redox respiratorio, y si esto afecta las pruebas de función pulmonar, el rendimiento deportivo de los atletas, o ambos.

En las próximas páginas, el lector encontrará el marco teórico que sustenta la presente tesis, seguido de los objetivos a desarrollar durante la formación doctoral y las herramientas experimentales adquiridas para alcanzar el logro de los objetivos propuestos, los artículos científicos y una discusión general de los resultados.

1.2 Resumen.

El estrés oxidativo se define como la pérdida de equilibrio entre los oxidantes y la capacidad de los antioxidantes para contrarrestar su acción, alterando la señalización redox y dañando los componentes de los organismos vivos (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN) a través de especies químicas reactivas (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015). El término oxidante incluye tanto a radicales libres (RL) como a todas aquellas especies químicas que sin ser RL también son capaces de sustraer uno o más electrones de un sustrato biológico, iniciando el proceso de oxidación. Como especies reactivas (*Reactive Species*, RS) se incluyen las derivadas del oxígeno (ROS), nitrógeno (RNS), cloro, bromo, azufre, etc. Las consecuencias biológicas del estrés oxidativo dependerán del tipo celular o tejido examinado, severidad, y duración o temporalidad de dicho desequilibrio. Así, las células pueden responder de una o más de las siguientes maneras: (i) proliferación aumentada; (ii) adaptación a través de la *up-regulation* o sobre-expresión de sistemas de defensas, los que pueden entregar una protección completa, parcial, o exagerada; (iii) injuria o daño de biomoléculas celulares que son los que iniciarán la favorable adaptación, es decir, no todo daño causado por el estrés oxidativo se traduce en un daño oxidativo; (iv) envejecimiento celular; y (v) muerte celular, dependiendo de si el daño a las biomoléculas celulares ha sido reparado favorablemente ya sea total o parcial, o en su defecto iniciar la apoptosis celular (Powers, Nelson, et al., 2011; Barry Halliwell & Gutteridge, 2015; Pizzino et al., 2017).

En condiciones fisiológicas, bajos niveles de RS son necesarios para la adecuada transcripción y traducción de señales celulares beneficiosas para la salud, mejorando la función del sistema inmunológico (Yang et al., 2013; Salim, 2016), cardiovascular (Khurana et al., 2013), muscular (Jackson, 2005; Niess & Simon, 2007; Powers, Ji, et al., 2011), entre otros; mientras que altos niveles o producción excesiva de RS alteran la integridad celular a través de la oxidación de lípidos (Ylä-Herttuala, 1999), proteínas (Stadtman & Levine, 2006), y ADN (Marnett, 2000), y promueven la inflamación crónica al estimular el factor transcripcional sensible a alteraciones del estado redox (factor nuclear-kappa β , $\text{NF-}\kappa\beta$), el cual estimula la expresión de mediadores pro-inflamatorios como proteína C-reactiva (PCR), interleuquinas (IL-6, IL-8, IL 1β), y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- 1α) (Reuter et al., 2010; Lugrin et al., 2014; Hussain et al., 2016), todos ellos son biomarcadores involucrados en el origen de diversas enfermedades (ej.

HTA, insuficiencia cardiaca, diabetes, síndrome metabólico, EPOC, cáncer, etc.) (Bast et al., 1991; Moskovitz et al., 2002; Pizzino et al., 2017).

Al respecto, la práctica de actividad física regular o ejercicio ha sido reconocida como la intervención terapéutica clave para evitar la progresión de estas enfermedades (B. Pedersen & Saltin, 2006, 2015; Kujala, 2009; Garber et al., 2011), y aumentar la supervivencia de los pacientes (Oja et al., 2017; Kraus et al., 2019). Paradójicamente, el ejercicio también es reconocido por desencadenar aumentos en los niveles de RS (Packer et al., 2008; Powers & Jackson, 2008; Powers, Ji, et al., 2011; Powers, Nelson, et al., 2011). El primer estudio que evidenció esto se publicó hace ya más de treinta años (Dillard et al., 1978). En ese estudio, Dillard et al. (1978) reportó en 10 sujetos sanos un aumento sustancial del pentano exhalado, un indicador de la peroxidación de lípidos, posterior a 60 minutos de cicloergómetro a intensidad moderada correspondiente al 50% del $\dot{V}O_2$ -máx. De ahí en adelante, varias investigaciones han estudiado el efecto del ejercicio sobre el estrés oxidativo. Al respecto, las fuentes productoras de RS durante el ejercicio físico se han diferenciado entre las intrínsecas al tejido muscular esquelético (ej. mitocondria, enzimas NADPH y xantino oxidasas) (Steinbacher & Eckl, 2015; Di Meo et al., 2019), y las extrínsecas (sangre, sistema cardiovascular, respiratorio, etc.) las cuales además de ser fuentes productoras de RS por sí mismas, también potencian a las fuentes intrínsecas aumentando aún más la presencia de RS por ejercicio físico (Finaud et al., 2006; Nikolaidis et al., 2008; Packer et al., 2008).

Dentro de las fuentes productoras de RS intrínsecas al tejido muscular se encuentra la mitocondria. La evidencia reporta que entre el 1-3% del oxígeno consumido contribuye a la formación de RS (Chance et al., 1979). Esto hace pensar que mientras mayor sea la actividad metabólica mitocondrial, como sucede en ejercicios intensos y prolongados, mayor será la producción de RS; sin embargo, el cambio conformacional de este organelo desde el reposo (*state-IV*) al de máxima actividad (*state-III*) reduce la producción de RS a una décima parte (Cadenas & Davies, 2000; Finaud et al., 2006). Otra fuente de RS asociada a la contracción muscular es la acción de la enzima NADPH oxidasa (NOX), la que se encuentra principalmente en el retículo sarcoplasmático, túbulos transversos, y sarcolema. Esta enzima cataliza la producción de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) al reducir al oxígeno molecular (O_2), reacción exacerbada en ejercicios prolongados e intensos; de esta manera a NOX se le ha atribuido un rol incluso mayor que a la mitocondria en la producción de RS por ejercicio (Steinbacher & Eckl, 2015; Ferreira & Laitano, 2016). También el fenómeno de isquemia-reperfusión, propio del acto motor en ejercicios

cíclicos y repetitivos, ha sido reconocido como promotor de RS a raíz de la mayor actividad de la enzima xantino oxidasa (XO) y la consecuente formación de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y urato (Steinbacher & Eckl, 2015; Di Meo et al., 2019). Sin embargo, la contribución de XO en la producción de RS en el territorio muscular es tema de debate, pues si bien evidencia actual le confiere un rol protagónico (Viña, Amparo Gimeno, Juan S, 2000; Gomez-Cabrera et al., 2008, 2009), otros estudios le confieren un rol menor dado la baja cantidad de XO presente a nivel tisular (Frederiks & Bosch, 1995).

El efecto beneficioso o perjudicial de la producción de RS de origen muscular, está condicionada a la intensidad, duración, y modalidad de ejercicio físico realizado (Finaud et al., 2006; Niess & Simon, 2007; Nikolaidis et al., 2008; Powers & Jackson, 2008; Powers, Ji, et al., 2011), pues se ha reportado que bajos niveles de RS incluso estimulan la producción de antioxidantes encargados de prevenir el estrés oxidativo local (Nikolaidis et al., 2008; Kujala, 2009; Magherini et al., 2019).

Otra fuente de producción de RS en el ejercicio son las provenientes de sistemas biológicos de origen no muscular, principalmente las originadas en el sistema cardiovascular a raíz del aumento en el gasto cardiaco en condiciones de máxima intensidad de ejercicio en alrededor 5 a 6 veces su valor respecto al reposo (D'Andrea et al., 2017); y las provenientes del sistema respiratorio, el cual debe aumentar $\dot{V}E$ (20 a 30 veces) a expensas de la frecuencia respiratoria (Fr) (4 a 5 veces) y volumen corriente (V_c) (4 a 6 veces) para maximizar la hematosis sanguínea, contenido arterial de oxígeno, y mejorar así el $\dot{V}O_2$ -máx. (Forster et al., 2012; Sheel & Romer, 2012). Ahora bien, la producción de RS de origen respiratorio no tan solo se ve afectada por los cambios de la mecánica respiratoria mencionados previamente, pues la literatura ha reportado aumentos en ciertas condiciones ambientales en las cuales se desarrolla el ejercicio. Así, la presencia de material particulado (MP) (Cavalcante De Sá et al., 2016) e irritantes respiratorios como el ión cloruro y sus derivados (Morissette et al., 2016), altura o hipobaría (Araneda & Tuesta, 2012), temperatura (Marek et al., 2013), y humedad ambiental (Wolkoff, 2018), son escenarios que promueven el estrés oxidativo al aumentar RS y/o disminuir antioxidantes locales, sobretodo en deportistas crónicamente expuestos a entrenar a elevados valores de $\dot{V}E$, Fr y V_c .

Interesantemente, el estado redox respiratorio puede ser evaluado a través del análisis de muestras locales como el esputo inducido (EI) (Pavord et al., 1997), aire espirado (AE) (Liu & Thomas, 2005), y condensado de aire espirado (CAE) (Horváth et al., 2005; M. Davis & Montpetit, 2018). El CAE permite la obtención no invasiva de

ciertos biomarcadores que han sido objeto de estudio para evaluar al efecto del ejercicio sobre el sistema respiratorio (Lactato, H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- , adenosina, MDA, pH, citoquinas, 8-isoprostano, etc.). En esta tesis se han estudiado especies químicas reactivas (H_2O_2 , NO_2^-) y pH en muestras de CAE para evaluar el efecto del ejercicio físico en diferentes condiciones ambientales sobre el estado redox respiratorio en deportistas entrenados y habituados a mantener elevados valores de \dot{V}_E , Fr y Vc. Para complementar este análisis químico, se evaluaron también parámetros clínicos de la función pulmonar midiendo los volúmenes y capacidades respiratorias mediante espirometría. Además, se exploró la evaluación objetiva del esfuerzo o trabajo respiratorio mediante la valoración de la oxigenación local en músculos respiratorios. El objetivo es reportar a través de mediciones no invasivas el impacto del ejercicio físico sobre el estado redox respiratorio, parámetros clínicos, y rendimiento físico en deportistas entrenados aeróbicamente, con la finalidad de evaluar asociaciones entre estas variables potenciando la investigación aplicada y traslacional; aportando conocimiento que ayude al entendimiento de los cambios en la salud respiratoria de atletas habituados a mantener elevados valores de ventilación pulmonar, esperando potenciar así el rendimiento deportivo.

1.3 Especies reactivas (*Reactive Species, RS*).

La definición de especies reactivas (RS) incluye tanto a radicales libres (RL) como a todas aquellas RS que, sin ser RL, son también capaces de sustraer uno o más electrones de un sustrato biológico, iniciando el proceso de oxidación (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015). Los RL se definen como átomos o moléculas que tienen uno o más electrones desapareados en su último orbital, lo que les otorga inestabilidad y reactividad. El hecho de que el material biológico produzca RL se reportó por primera vez en 1954 y en la actualidad es ampliamente aceptado (Commoner et al., 1954). Los principales RL formados en las células son el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico (NO^{\cdot}). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede ser generado ya sea por la reducción incompleta del oxígeno en el sistema transportador de electrones, o como un producto específico de sistemas enzimáticos; mientras que el NO^{\cdot} es generado vía reacciones enzimáticas. Ambos RL pueden rápidamente reaccionar con otros átomos o moléculas y formar RS, que pueden reaccionar con mayor o menor selectividad, generando más RL y RS (Powers, Ji, et al., 2011). Como RS se incluyen las derivadas del oxígeno (ROS), nitrógeno (RNS), cloro,

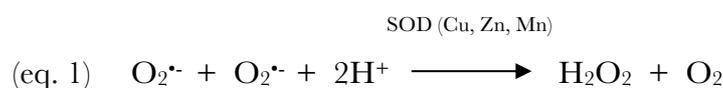
bromo, azufre, etc.; siendo las más involucradas en el humano las ROS y RNS. La tabla 1 menciona los principales RS en el contexto de esta tesis.

Tabla 1. Nomenclatura de especies reactivas.

Radical libre	No radical libre
Anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Radical hidroxilo, OH^{\bullet}	Oxígeno singulete, 1O_2
Oxido nítrico, NO^{\bullet}	Peroxinitrito, $ONOO^-$
Dióxido de nitrógeno, NO_2^{\bullet}	Acido hipocloroso, $HClO$ o $HOCl$
Átomo de cloro, Cl^{\bullet}	Cloraminas

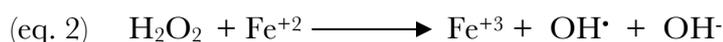
Las principales RS analizadas en estudios relacionadas al efecto del ejercicio físico sobre el estado redox son $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2 , 1O_2 , NO^{\bullet} , NO_2^{\bullet} , NO_3^- , $ONOO^-$, $HClO$. A continuación, se detallan sus características:

- (1) Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$): Es el RL mas abundante y común a nivel celular. Se forma por procesos enzimáticos, reacciones de auto-oxidación, y reacciones no enzimáticas de transferencia de electrones en el cual un electrón es transferido al oxígeno molecular. En comparación a otras RS posee una vida media prolongada (10^{-6} s) lo que facilita la difusión intracelular y la afectación a un mayor número de células (Phaniendra et al., 2015). Es principalmente producido al interior de la mitocondria. Las enzimas que pueden producir $O_2^{\bullet-}$ son la xantino oxidasa (XO), lipoxigenasa, cicloxigenasa y NADPH oxidasa. Puede existir en 2 formas, como $O_2^{\bullet-}$ a pH fisiológico, o como radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}) a pH bajo. El $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con otro $O_2^{\bullet-}$ en la reacción de dismutación (eq. 1), donde un radical es oxidado a oxígeno y otro radical es reducido a otro RS, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta reacción es catalizada por elementos químicos (Cu, Zn, Mn) y la enzima superóxido dismutasa (SOD).



- (2) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): No es un radical libre, si no una RS que puede producir RL, como el radical hidroxilo (OH^{\bullet}). El H_2O_2 es estable, permeable a las

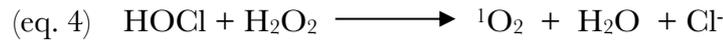
membranas celulares, y con una vida media prolongada. Es un agente oxidante relativamente débil, pero a altas concentraciones es citotóxico. Esta característica se debe a la capacidad de generar OH^\bullet a través de reacciones catalizadas por metales, como la reacción de Fenton (eq.2) (B Halliwell et al., 2000). Las mayores enzimas antioxidantes que pueden eliminar H_2O_2 son la catalasa, glutatión peroxidasa y peroxiredoxinas.



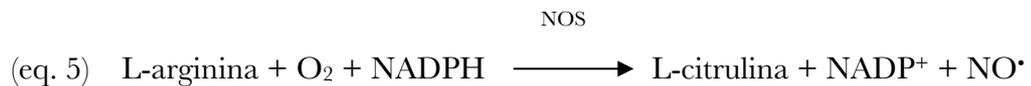
- (3) Radical hidroxilo (OH^\bullet): Es un radical libre de elevado poder oxidante y reactividad, pudiendo dañar a moléculas inorgánicas y orgánicas, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN, mas que cualquier otro RL. A pesar de no ser permeables a membranas biológicas y poseer una vida media corta (10^{-10} s), la gran reactividad que posee le permite dañar a las moléculas cercanas al sitio de producción, por lo que no es factible evaluar su concentración directa, pero si la demostración de los productos específicos de sus reacciones (Phaniendra et al., 2015). Su formación es en la reacción de Fenton (eq. 2), en donde el H_2O_2 reacciona con metales iónicos (Fe^{+2} o Cu^+) los que generalmente se encuentran en complejos con diferentes proteínas como la ferritina (proteína intracelular que almacena hierro) y ceruloplasmina (proteína plasmática transportadora de cobre) u otras moléculas. En condiciones de estrés, un exceso de $\text{O}_2^{\bullet-}$ libera hierro de proteínas de ferritina, este hierro libre participa en la reacción de Fenton y forma OH^\bullet . También puede ser formado en la reacción Haber-Weiss (eq. 3).



- (4) Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$): Esta especie reactiva corresponde a la forma electrónicamente excitada del estado meta-estable del oxígeno molecular. Tiene una vida media corta (10^{-6} s), pero posee gran difusión y permeabilidad en las membranas biológicas. La dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en agua puede llevar a la formación de $^1\text{O}_2$ en los sistemas biológicos. Puede ser producido *in vivo* por la activación de neutrófilos (eq. 4) y eosinófilos (Hampton et al., 1998; Winterbourn & Kettle, 2013); al igual que en reacciones enzimáticas catalizadas por lipoxigenasas, dioxigenasas, y lactoperoxidasas.



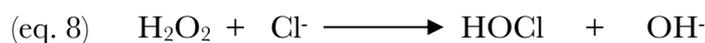
- (5) Oxido nítrico (NO^\bullet): Es un radical libre sintetizado en varios tipos celulares a partir del aminoácido L-arginina, utilizando NADPH y produciendo L-citrulina (eq. 5). Esta síntesis la realizan las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS), existiendo 3 tipos: (i) neuronal (nNOS o NOS1); (ii) endotelial (eNOS o NOS3); y (iii) inducible (iNOS o NOS2) (Ricciardolo et al., 2004). Es altamente soluble en agua y lípidos, por lo tanto, puede atravesar el citoplasma y membranas plasmáticas. Es un importante segundo mensajero intracelular, estimulando guanilato ciclasa y proteínas quinasas que ayudarán a la relajación en los vasos sanguíneos. Se ha demostrado que el ejercicio físico induce la activación de la NOS presente en las membranas, mitocondria, células endoteliales, miocitos cardíacos, células inmunes (macrófagos), musculatura lisa, entre otras (Roberts et al., 1999). Posee una débil capacidad reductora, reacciona con oxígeno para formar dióxido nítrico, y reacciona muy rápidamente con $\text{O}_2^{\bullet-}$ y produce ONOO^- . En algunas células (macrófagos, células endoteliales), NO^\bullet es un intermediario de la vía de la arginina en su transformación a nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) (eq. 6).



- (6) Peroxinitrito (ONOO^-): La reacción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ con NO^\bullet produce peroxinitrito (eq. 7) ocurre tres veces más rápido que la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ para producir H_2O_2 . Esto permite que sea la reacción primaria cuando están presentes tanto $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO^\bullet . Posee una vida media prolongada (10^{-3} s) y gran capacidad oxidante, dañando el ADN, nitración de proteínas, y depleción de los grupos tiol.



- (7) Ácido hipocloroso (HClO o HOCl): Es formado por la acción de la enzima mieloperoxidasa utilizando H_2O_2 (eq. 8). Es una RS estable y comúnmente formada por neutrófilos, pudiendo dañar biomoléculas a través de la oxidación de grupos tiol, lípidos, ascorbato, y NADPH con la generación de productos secundarios (Powers, Ji, et al., 2011).



1.4 Antioxidantes.

Dada la importancia de mantener la homeostasis del estado redox celular, cada tejido u órgano posee una cantidad de sustancias encargadas de retardar o prevenir el daño oxidativo de las RS, estas corresponden a los antioxidantes los que dependiendo de su origen se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015). Los principales antioxidantes enzimáticos del sistema respiratorio implicados en el ejercicio son: superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y una serie de otras llamadas “auxiliares” (TRX, PRX, y GRX) (Heffner & Repine, 1989; Bast et al., 1991). Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran la mucina, urato, glutatión (GSH), vitamina C (ácido ascórbico), ceruloplasmina, transferrina, vitamina E, ferritina y bilirrubina, entre otros (Powers & Hamilton, 1999; Powers et al., 2004; Radak et al., 2017).

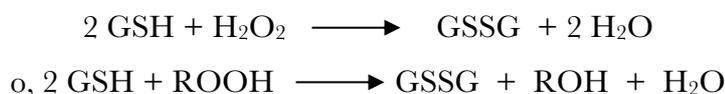
1.4.1 Antioxidantes enzimáticos:

Los principales antioxidantes enzimáticos son superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), y catalasa (CAT). Otras antioxidantes reductasas como las peroxiredoxinas (PRXs), glutaredoxinas (GRXs), y tioredoxinas (TRXs) también contribuyen a la protección celular contra el proceso de oxidación inducido por las RS, y se engloban en las llamadas enzimas “auxiliares”:

- (1) Superóxido dismutasa (SOD): Esta enzima entrega protección contra el $\text{O}_2^{\bullet-}$, específicamente cataliza la reacción produciendo H_2O_2 y O_2 (eq. 1). En las células de mamíferos existen 3 isoformas de SOD (SOD1, SOD2 y SOD3), y cada una incorpora un metal de transición en el sitio activo útil para catalizar la reacción.

SOD1 se ubica tanto en el citosol como en el espacio intermembrana de la mitocondria; SOD2 se localiza en la matriz mitocondrial; y SOD3 en el espacio extracelular. Aunque el $O_2^{\cdot-}$ es un RL no altamente reactivo, igual puede extraer electrones de membranas biológicas u otros componentes celulares, resultando en una cadena de reacciones que originen nuevos RL. Además, el $O_2^{\cdot-}$ puede participar en la formación de otras RS más reactivas como el OH^{\cdot} y $ONOO^{\cdot-}$, por lo que es adecuado siempre mantener bajos los niveles de $O_2^{\cdot-}$ (Heffner & Repine, 1989; Powers & Hamilton, 1999; Powers et al., 2004).

- (2) Glutación peroxidasa (GPXs): Existen 5 tipos de GPXs en células de mamíferos. Cada una cataliza la reducción de H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos (ROOH) a agua (H_2O) y alcohol (ROH), respectivamente, usando para ello glutatión reducido (GSH). Específicamente, un par de moléculas de GSH entregan iones hidrógenos y son oxidados a glutatión disulfido (GSSG). En el sistema respiratorio es producida y secretada por células del epitelio alveolar y macrófagos (Avisar et al., 1996; Schamberger et al., 2016).



- (3) Catalasa (CAT): Esta enzima cataliza la reacción que disocia el H_2O_2 . Se encuentra principalmente en el citosol, específicamente en el retículo endoplasmático, mitocondrias y peroxisomas. En comparación con GPX se ha documentado que tiene baja afinidad por H_2O_2 cuando se encuentra a baja concentración (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015).



- (4) Enzimas antioxidantes “auxiliares”: Sumado a las enzimas antioxidantes descritas previamente, las células de mamíferos también poseen un grupo de otras enzimas que dada su cantidad presente a nivel celular se han denominado como “auxiliares”, cumpliendo funciones similares en la mantención de la homeostasis del estado redox. Dentro de este grupo se nombran las tioredoxinas (TRXs), glutaredoxinas (GRXs), y peroxiredoxinas (PRXs). Las TRX participan en

mantener las proteínas en su estado reducido y prevenir la apoptosis celular (Arnér & Holmgren, 2000; Lu & Holmgren, 2014). Las GRX participan en la protección y reparación de proteínas y grupos no proteicos tiol durante el estrés oxidativo (Berndt et al., 2007). Las PRX reducen H_2O_2 y ONOO^- usando fisiológicamente electrones provenientes de grupos tiol (Sue et al., 2005).

1.4.2 Antioxidantes no enzimáticos:

En el sistema respiratorio humano las células epiteliales se encuentran recubiertas por el fluido de revestimiento del epitelio respiratorio, el cual contiene surfactante y una serie de antioxidantes no enzimáticos incluyendo glutatión reducido (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), taurina, ácido úrico, α -tocoferol (vitamina E), ceruloplasmina, proteínas de bajo peso molecular, productos secretores de células serosas y caliciformes, más las enzimas antioxidantes nombradas previamente (Cross et al., 1994). A continuación, se entregan detalles de los más abundantes en el sistema respiratorio humano:

- (1) Mucina: Conforman la capa mucosa del fluido de revestimiento epitelial y está compuesta de proteínas, principalmente serina y treonina. Representa la primera “línea de defensa” a RS, tanto por sus propiedades intrínsecas antioxidantes, como por entregar en forma de “sacrificio” a RS algunas biomoléculas presentes en ella.
- (2) Acido úrico: Se le atribuye el ser el mayor antioxidante de bajo peso molecular presente en el tracto respiratorio, principalmente de vía aérea alta. Su concentración es similar a la del plasma, y su rol es relevante en contrarrestar la acción oxidante del ozono (O_3).
- (3) Glutatión (GSH): Es un antioxidante abundante tanto en el fluido de revestimiento como en células epiteliales del tracto respiratorio. Su concentración en el sistema respiratorio se estima sea 140 veces mayor que la del plasma (Biswas & Rahman, 2009). Participa en reducir el H_2O_2 y formar H_2O y O_2 utilizando glutatión reducido (GSH), convirtiéndolo a oxidado (GSSG). Este último se reconvierte a GSH gracias a la acción de la enzima glutatión reductasa, utilizando NADPH (figura 1).

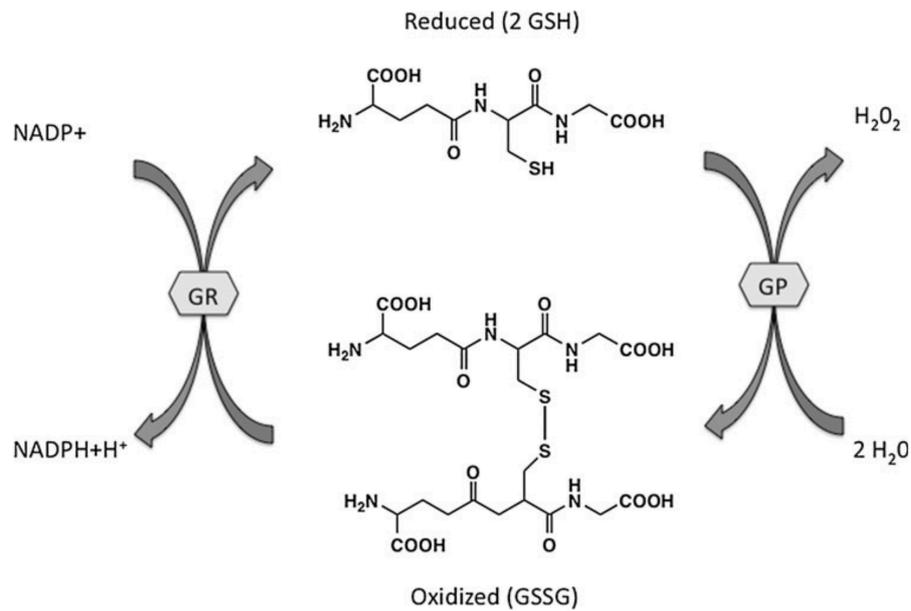


Figura 1. Esquema de reacciones del glutatión.

Figura extraída de Xiong et al (2011) (Xiong et al., 2011).

- (4) **Acido ascórbico (vitamina C):** Es un importante antioxidante extracelular soluble en agua. Su rol es entregar electrones a diferentes RS, siendo los principales H₂O₂ y OH⁻. También tiene un rol activo en reducir la vitamina E oxidada usando GSH, restaurando así la capacidad antioxidante de este importante antioxidante lipídico.
- (5) **α-tocoferol (vitamina E):** Es soluble en lípidos, cuyo rol principal es detener reacciones en cadena iniciadas por la lipoperoxidación protegiendo así a ácidos grasos no saturados de membranas biológicas del proceso de oxidación.
- (6) **Albúmina:** Esta proteína está presente normalmente en alta concentración en el fluido de revestimiento epitelial respiratorio. Puede inhibir OH⁻ y HOCl a través de α1-antitripsina. Además, une eficientemente los iones de hierro y cobre pudiendo prevenir reacciones similares a la de Fenton y así la lipoperoxidación.

1.5 Daño por RS sobre biomoléculas.

Cuando hay un desequilibrio entre la producción de RS y las defensas antioxidantes, las RS se producirán en alta concentración dañando biomoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN) (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015). Los mecanismos de daño más comunes se mencionan a continuación:

- (1) **Lípidos:** Los lípidos presentes en las membranas biológicas, especialmente los residuos de ácidos grasos poli-insaturados de fosfolípidos son los más susceptibles a la oxidación por RS (Phaniendra et al., 2015). Este proceso implica la pérdida de la integridad de las membranas biológicas y con esto la función celular (fluidez, inactivación de canales o receptores, entre otros). La lipoperoxidación se inicia cuando una RS reacciona y extrae un hidrógeno de un grupo metileno ($-\text{CH}_2$) en un ácido graso, lo que resulta en la formación de un radical lipídico centrado en el carbono ($\text{L}\cdot$). Este $\text{L}\cdot$ puede reaccionar con un O_2 y formar un radical peroxilipídico ($\text{LOO}\cdot$) el cual es inestable y puede reaccionar con otro ácido graso produciendo un nuevo ciclo de radical $\text{L}\cdot$, el cual uniéndose nuevamente a O_2 incrementará la concentración de $\text{LOO}\cdot$, continuando así la reacción en cadena de la lipoperoxidación; o por otra parte, el $\text{LOO}\cdot$ podrá formar aldehídos estables siendo los más comunes el malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal, y los isoprostanos; estos productos finales de la lipoperoxidación dañarán proteínas y el ADN (Marnett, 2002; Niki, 2008; Henkel, 2011). El proceso de terminación ocurre cuando dos RS reaccionan y forman una especie no radical, normalmente esto acontece a concentraciones elevadas de RS. La figura 2 ilustra el proceso de oxidación lipídica. Los MDA e isoprostanos han sido utilizados para evaluar daño oxidativo inducido por ejercicio en el sistema muscular y respiratorio. A través de muestras de CAE se han determinado aumento de $[\text{MDA}]_{\text{CAE}}$ en atletas después del ejercicio intenso en condiciones de hipobaría (Araneda et al., 2005), y $[\text{8-isoprostanos}]_{\text{CAE}}$ en presencia de irritantes respiratorios como ocurre en piscinas tratadas con cloro (Morissette et al., 2016), lo que refuerza la idea de que además del aumento de la ventilación pulmonar (\dot{V}_E), otros factores presentes en el desarrollo del ejercicio físico pueden influenciar en la mayor producción de daño oxidativo asociado al ejercicio.

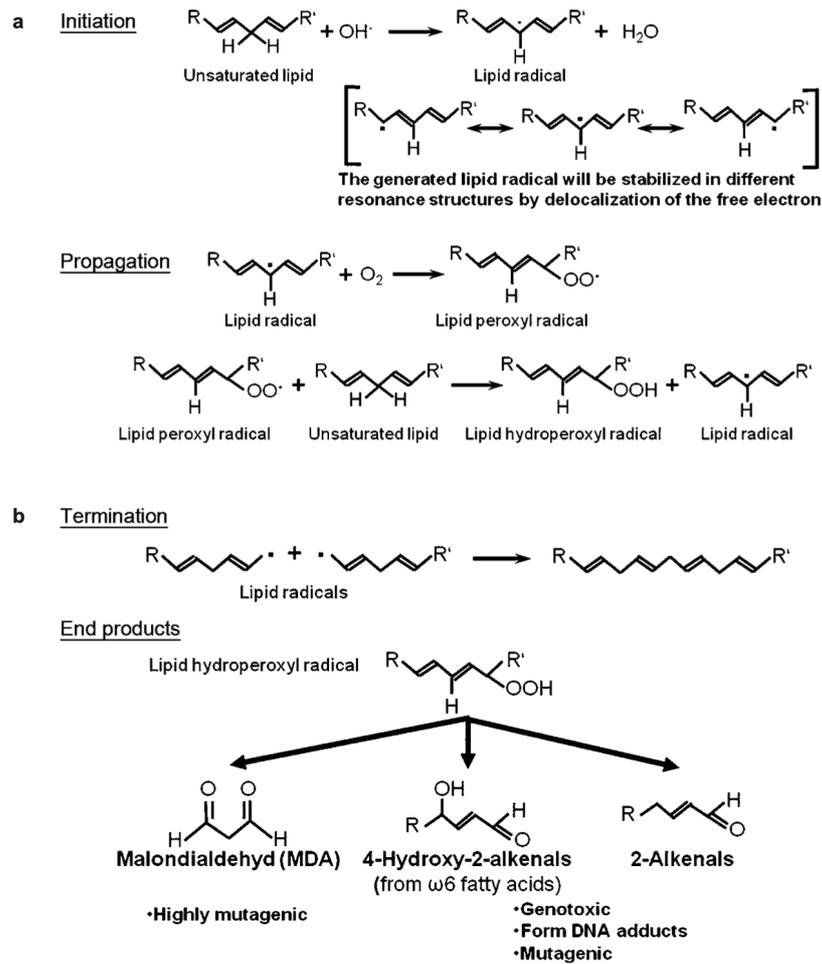


Figura 2. Etapas de la oxidación de los lípidos.

(a) Fases de iniciación y propagación por radicales. En la fase de propagación, el radical lipídico reacciona con el oxígeno molecular para formar un radical peroxilipídico que propaga la reacción por medio de una reacción en cadena radical. (b) En la fase de terminación, dos radicales lipídicos reaccionan entre sí para formar un enlace estable. Además, a partir de los radicales peroxilipídicos, se forman una variedad de productos de degradación como malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal o 2-alkalenos. Estos productos finales afectan el ADN y proteínas. Figura extraída de Henkel (2011) (Henkel, 2011).

- (2) **Proteínas:** El daño a las proteínas puede ocurrir por el ataque directo de ciertos radicales libres ($\text{OH}\cdot$ siendo el más reactivo) o no radicales (ej. H_2O_2 , O_3 , HOCl , $\text{OONO}\cdot$, $^1\text{O}_2$), o por "daño secundario" que implica la reacción con productos finales de la lipoperoxidación, como MDA e hidroxynonenal (Phaniendra et al., 2015). Las proteínas también pueden dañarse por glicación/glicoxidación. Algunos "daños" proteicos son reversibles, como generación de enlaces disulfuro, formación de ácido sulfónico, formación de sulfóxido de metionina, S-nitrosilación, destrucción de grupos Fe-S por O_2 , glutatión y posiblemente

nitración. Otro daño, como la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos o la escisión del esqueleto del péptido, puede ser irreversible y la proteína debe ser destruida y reemplazada. El daño oxidativo al ADN (a través de la mutación) y al ARN (a través de una traducción errónea) también puede producir proteínas defectuosas. La oxidación de proteínas afectará la función enzimática, inmune, de transporte y estructural (receptores) en membranas biológicas, haciéndolas así más susceptibles a degradación proteolítica (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015). La evidencia muestra que algunos aminoácidos al oxidarse dan lugar a grupos carbonilos los que pueden ser evaluados como indicador de daño oxidativo de proteínas (Chevion et al., 2000). Respecto al impacto del ejercicio sobre el daño oxidativo en proteínas aun los resultados son controversiales. Estas diferencias se han asociado al nivel de entrenamiento de los participantes y tiempo de medición posterior al esfuerzo ejecutado (Finaud et al., 2006).

- (3) ADN y ARN: Es un proceso lento y muy dañino. No todos los RS dañan el ADN, y dado la reactividad el mayor responsable es el OH^\bullet , el cual reacciona directamente con las bases purinas y pirimidinas, y las pentosas. El OH^\bullet abstrae un átomo de hidrógeno y puede dañar a la base guanina en su posición y producir 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), el cual es evaluado como biomarcador de daño oxidativo e involucrado en la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Barry Halliwell & Gutteridge, 2015). En lo respecto al ejercicio, la producción de 8-OHdG se ha evaluado sin reportar cambios significativos (Reichhold et al., 2008; Reichhold, Neubauer, Hoelzl, et al., 2009; Wagner et al., 2011), posiblemente por la rápida de reparación de ADN después del proceso de oxidación y/o características propias del desarrollo del ejercicio físico (Reichhold, Neubauer, Bulmer, et al., 2009).

1.6 Ejercicio y fuentes de origen de RS en el sistema respiratorio.

El ejercicio físico aeróbico conlleva aumento en las demandas metabólicas, producto de la mayor actividad contráctil de grupos musculares involucrados en el acto motor; cardiovasculares, a consecuencia del incremento en el cronotropismo, inotropismo y vasodilatación sistémica; y respiratorias, por la mayor ventilación pulmonar (\dot{V}_E),

frecuencia respiratoria (Fr), volumen corriente (Vc), dilatación bronquial y vascular pulmonar, y acción muscular respiratoria (*work of breathing*, WOB). En condiciones fisiológicas normales, todos estos cambios se realizan gracias a la energía generada en células eucariontes, aumentando la actividad mitocondrial y por consecuencia, la probabilidad de aumentar la producción de RS (Valavanidis et al., 2013). Por otra parte, características propias a la actividad física (duración, modalidad, intensidad y volumen de ejercicio) y a las condiciones ambientales donde se realiza (altura (hipobaría), temperatura, humedad ambiental, contaminación (material particulado) o irritantes respiratorios (ej. ión cloruro y bioderivados, polen, ozono) impactarán en forma directa sobre la producción de RS del sistema respiratorio, y en forma indirecta, lo harán a consecuencia de la inflamación de vía aérea y pulmonar inducida por ejercicio, fenómeno que de manera intrínseca conlleva la producción de mayor RS a consecuencia de la activación de mecanismos de defensa presentes en el sistema respiratorio (Araneda et al., 2016). Lo anterior también inducirá la liberación de factores hormonales asociados al estrés, como el cortisol y las catecolaminas, los que activarán el sistema inmunológico provocando la liberación de citoquinas y derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos), los que activarán mayor número de leucocitos y con ello la cantidad de RS producidas a consecuencia del ejercicio físico (Walsh & Whitham, 2006; Yang et al., 2013).

Otro aspecto relevante relacionado al impacto del ejercicio sobre la producción de RS del sistema respiratorio se relaciona con la exposición aguda (respuestas) o crónica (adaptaciones) y del modelo sobre el cual se evalúan estas especies químicas (animal o humano); a su vez, el efecto dañino o no sobre las biomoléculas dependerá del balance de RS con antioxidantes (enzimáticos o no), los cuales también han evidenciado cambios con el ejercicio físico (Cross et al., 1994; Powers & Hamilton, 1999; Powers et al., 2004; Gomez-Cabrera et al., 2008).

A continuación, se mencionan las principales fuentes productoras de RS del sistema respiratorio en consideración al contexto previamente mencionado:

- **Mitocondria:** Es la principal fuente de origen de RS. Durante el ejercicio, y dada la mayor tasa metabólica necesaria para satisfacer las demandas tisulares la producción de RS aumenta (Cadenas & Davies, 2000; Powers & Jackson, 2008). La síntesis de ATP se origina a raíz de una serie de reacciones químicas en la membrana interna de este organelo, en conjunto con la fosforilación oxidativa.

La literatura reporta que entre el 1% al 3% del oxígeno necesario para la producción de energía forma RS ya que no finaliza en la formación de la molécula de agua (Finaud et al., 2006). Las principales RS son anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y son producidos en los complejos proteicos I (NADH deshidrogenasa), II (Succinato deshidrogenasa) y III (Coenzima Q y citocromo C oxidasa/reductasa) de la cadena transportadora de electrones (CTE) (Treberg et al., 2010; Wong et al., 2017; Zhao et al., 2019). La figura 3 muestra los sitios de “fuga” de electrones y protones en la CTE.

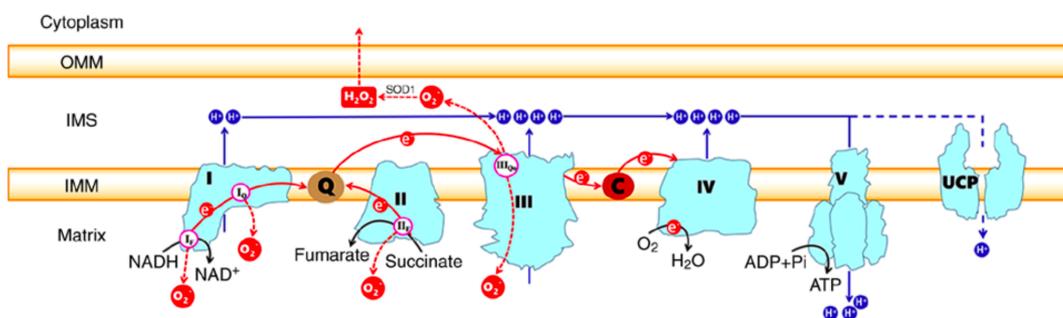


Figura 3. Sitios de fuga de electrones y protones en la mitocondria.

Los electrones derivados de sustratos oxidables se pasan a través de los complejos proteicos I/III/IV o cII/III/IV en un proceso exergónico que permite el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana de la mitocondria (IMS) de cI, cIII y cIV. La energía del gradiente de protones impulsa la síntesis de ATP por el complejo V, o puede ser consumida por UCPs. Se indican también los sitios de producción de anión superóxido en cada complejo. El oxígeno liberado en el IMS puede transformarse en agua en una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y peróxido de hidrógeno, para luego difundirse en el citoplasma. Las flechas rojas indican vías de electrones. Las flechas negras representan las reacciones del sustrato. Las flechas azules muestran el circuito de protones a través de la membrana interna mitocondrial (IMM). En celeste, los complejos I-V están marcados como I, II, III, IV, V, respectivamente. Q, ubiquinona; c, citocromo c; IMM, membrana mitocondrial interna; IMS, espacio intermembrana; OMM, membrana mitocondrial externa; UCP, proteína de desacoplamiento. Figura extraída de Zhao et al. (2019) (Zhao et al., 2019).

- Xantino deshidrogenasa (XOD) y oxidasa (XO): Estas enzimas catalizan la reacción desde hipoxantina a xantina, y posteriormente a ácido úrico. En el fenómeno de isquemia-reperfusión son consideradas como las fuentes prioritarias de producción de RS (Granger & Kviety, 2015; Battelli et al., 2016). En atletas y posterior al ejercicio se ha visto aumento de su actividad (Gómez-Cabrera et al., 2003). La figura 4 muestra el rol de XOD y XO en la producción de RS.

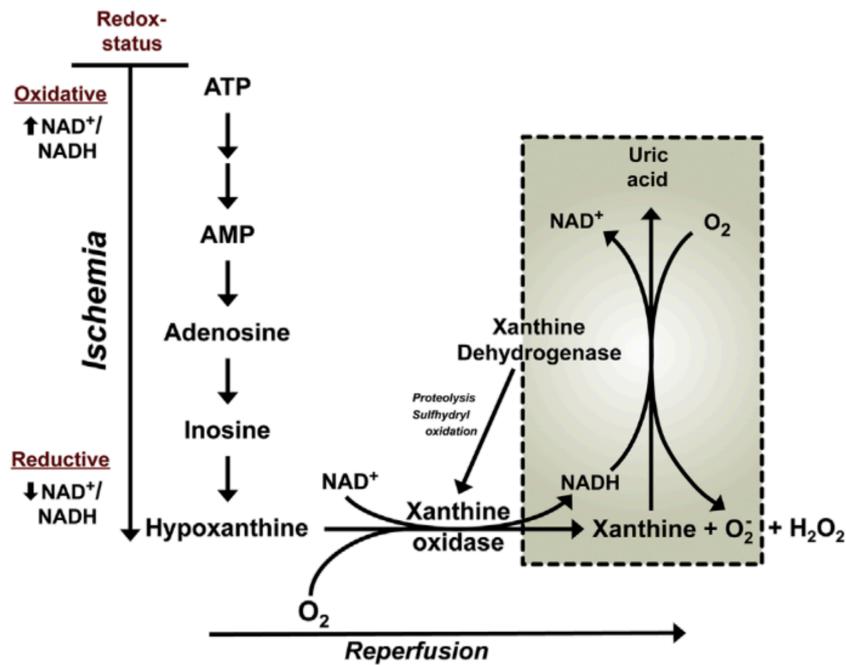


Figura 4. Mecanismos de producción de especies reactivas por el complejo enzimático XO-XOD.

En el contexto de la isquemia, el ATP se cataboliza a hipoxantina y la forma deshidrogenada de XO (XOD) se convierte a forma de oxidada (XO). Tras la reperusión, el tejido restaurado en oxígeno reacciona con hipoxantina (o xantina) y XO para generar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pudiendo interactuar con otras RS. La conversión de XOD a XO puede no ser necesaria para la producción de RS después de la reperusión. Durante la isquemia, el estado redox del tejido se altera de un estado oxidativo (mayor nivel de NAD^+ en relación con $NADH$) a un estado reducido. Figura extraída de Granger et al. 2015 (Granger & Kvietyts, 2015)

- **NADPH oxidasas (NOXs):** Corresponden a un complejo de enzimas asociadas a las membranas celulares, las que actúan entregando electrones en la reacción que reduce el O_2 a $O_2^{\cdot-}$. El $O_2^{\cdot-}$ producido en contacto con la enzima SOD producirá H_2O_2 . El $O_2^{\cdot-}$ también puede reaccionar con NO^{\cdot} , produciendo $ONOO^-$ (Brandes et al., 2014; Schröder, 2019). Se ha reportado aumento de la actividad de estos complejos enzimáticos posterior al ejercicio agudo de alta intensidad en células musculares esqueléticas (Powers, Nelson, et al., 2011; Alves et al., 2020), y disminución posterior a programas de entrenamiento aeróbico (Niess & Simon, 2007; Gomes et al., 2012; Ferreira & Laitano, 2016; de Sousa et al., 2017; Radak et al., 2017). Las figuras 5 y 6 muestran la composición de estos complejos enzimáticos, y los factores que participan en la activación y, por ende, en la producción de RS, respectivamente.

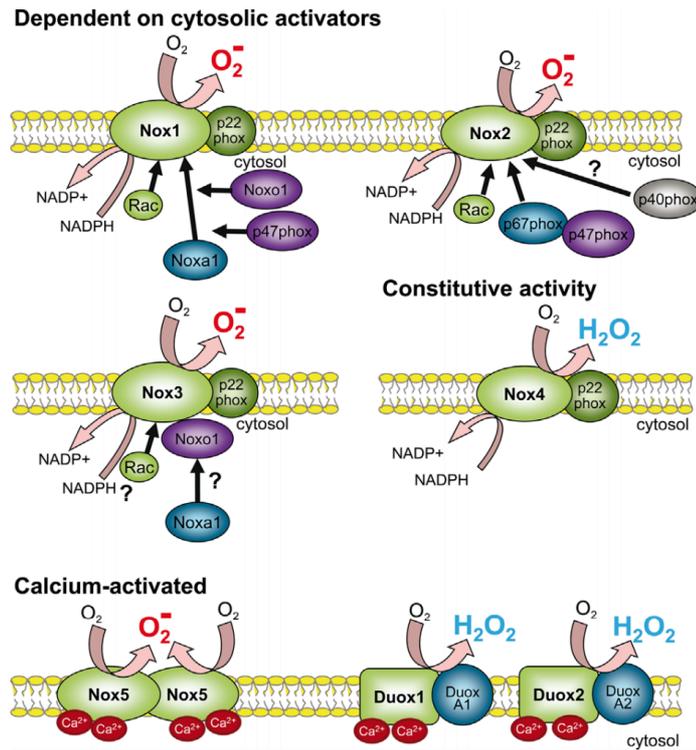


Figura 5. Composición de los complejos de enzimas NOX.

Figura extraída de Brandes et al. (2014) (Brandes et al., 2014)

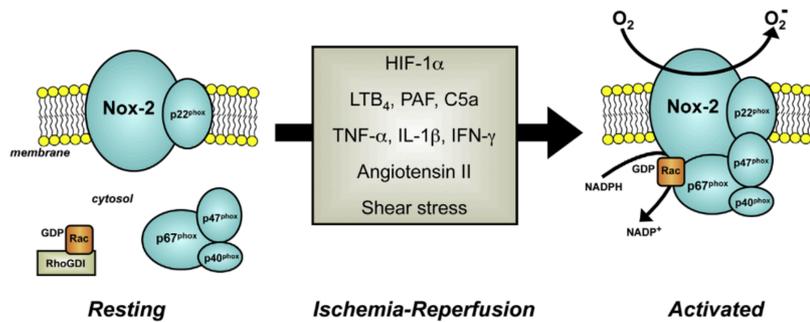


Figura 6. Factores que pueden activar NOX y aumentar las especies reactivas.

Figura extraída de Granger & Kvietys. 2015 (Granger & Kvietys, 2015)

Otro mecanismo involucrado en el desarrollo del ejercicio que puede alterar el estado redox local es la inflamación del sistema respiratorio (Bonsignore, Morici, Vignola, et al., 2003; Bonini & Silvers, 2018). La respuesta inflamatoria es consecuencia de varios factores, destacando en forma particular el aumento en $\dot{V}E$, flujo respiratorio, deshidratación del fluido epitelial de la vía aérea, hiperosmolaridad local, dilatación

bronquial y flujo sanguíneo local. Además, características ambientales del lugar donde se realice el ejercicio van a exacerbar aun más este fenómeno; así, el aire frío y seco (Marek et al., 2013), altura (Araneda et al., 2005), contaminación (Xiong et al., 2011; Cavalcante De Sá et al., 2016), e inhalación de irritantes respiratorios (Bougault et al., 2009; Bougault & Boulet, 2012) han sido factores asociados a la ponderación de RS e inflamación del sistema respiratorio a consecuencia del ejercicio. Cuando esto ocurre, aumenta la actividad de macrófagos (neutrófilos y leucocitos) habitualmente presentes tanto en la vía aérea como territorio alveolar, liberando mediadores solubles (citoquinas) y derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos), lo que puede en algunos casos incluso suprimir la acción del sistema inmunológico y desencadenar estrés oxidativo y alterar el balance redox local (Bonsignore, Morici, Vignola, et al., 2003; Kippelen et al., 2018; Lim & Nair, 2018). La figura 7 muestra un esquema de los factores involucrados en el balance redox respiratorio que pueden verse alterados a consecuencia del ejercicio físico y factores ambientales asociados.

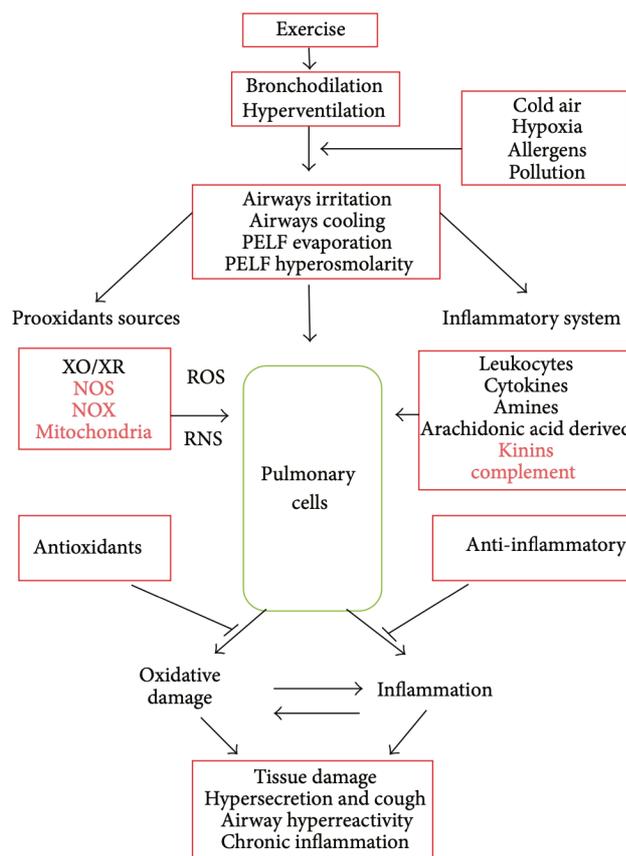


Figura 7. Mecanismos implicados en el daño oxidativo e inflamación pulmonar inducida por ejercicio.

En color rojo se aprecian las fuentes de origen de RS y las partes del sistema inflamatorio que no se han estudiado. XO/XR: xantina oxidasa/deshidrogenasa; NOS: óxido nítrico sintasa; NOX: NADPH oxidasa; PELF: fluido de revestimiento del epitelio respiratorio. Figura extraída de Araneda et al. 2016 (Araneda et al., 2016).

Dentro de los marcadores más comunes reportados en la literatura para evaluar el estado de inflamación del sistema respiratorio se encuentran:

- pH: La disminución del pH se relaciona a enfermedades inflamatorias (Horváth et al., 2005; Knobloch et al., 2008; Papaioannou et al., 2011; Ahmadzai et al., 2013; de Lima et al., 2013; Aldakheel et al., 2016), pero con resultados diversos en sujetos sanos. Así, se ha reportado que el pH de muestras de CAE aumenta (Riediker & Danuser, 2007), disminuye (Bikov et al., 2014), o no cambia (Araneda et al., 2014; Tuesta et al., 2016).
- Citoquinas: A nivel respiratorio, estas proteínas son producidas principalmente por los macrófagos presentes tanto en el epitelio respiratorio como alveolos. Las interleuquinas (IL-6) y polimorfonucleares (PMN) son los más estudiados, con resultados que dan cuenta del aumento a consecuencia del ejercicio físico (Bonsignore, Morici, Riccobono, et al., 2003; Chimenti et al., 2009, 2010; Kippelen & Anderson, 2012).
- Derivados del ácido araquidónico: Son producidas como respuesta inflamatoria e inmunológica. Los más evaluados son las prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos. También se ha documentado el aumento en deportistas posterior a ejercicio físico (Pucsok et al., 2007; Araneda et al., 2016).

En resumen, el sistema respiratorio aumenta su exposición al aire ambiental cuando se realiza ejercicio físico, incrementando la producción de RS. Dependiendo de las características del ejercicio físico (modalidad, duración, intensidad, y volumen), y del ambiente en donde sea realizado (temperatura y humedad ambiental, altura, contaminación y/o irritantes respiratorios) dependerá la producción de RS. A esto se suma la posible inflamación del sistema respiratorio, con el respectivo impacto sobre la producción de RS. Este escenario se contrastará con los antioxidantes respiratorios (enzimáticos o no) para evaluar el posible estrés oxidativo y su potencial impacto sobre el balance redox local. La literatura al respecto es variada, y los resultados dependerán de las características de los participantes evaluados (ej. deportista o sedentario o con enfermedades), del tipo de muestra biológica analizada (ej. esputo inducido, aire espirado, condensado de aire espirado, lavado broncoalveolar, biopsias, etc.), de las técnicas de análisis de las especies químicas reactivas (ej. espectrofotometría, HPLC, etc.), y de las RS (ej. oxígeno singulete, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, oxido

nítrico, peroxinitrito, nitrito, nitrato, etc.) y/o parámetros inflamatorios a analizar (ej. IL-6, PMN, Leucocitos, etc.), entre otros elementos.

Esta tesis evalúa RS recolectadas en muestras de condensado de aire espirado (CAE), por lo que a continuación se detallarán las ventajas y desventajas de las técnicas y los resultados reportados en la literatura respecto al impacto del ejercicio físico en deportistas (respuestas agudas y crónicas).

1.7 Técnicas de recolección de muestras respiratorias.

Para evaluar el impacto respiratorio en humanos frente a condiciones posiblemente dañinas como el aumentar el flujo aéreo (ej. ejercicio) en condiciones adversas ambientales (ej. frío o calor, alta y/o baja humedad relativa), y/o con presencias de material particulado y/o irritantes respiratorios (ej. cloro y derivados, ozono, azufre) se han utilizado diferentes métodos invasivos (ej. biopsia pulmonar, fibrobroncoscopia, lavado broncoalveolar) y otros no invasivos (ej. esputo inducido, aire espirado, condensado de aire espirado (CAE)) (Horváth et al., 2005, 2017). Una de las principales ventajas de estos últimos es la posibilidad de obtener varias muestras de un mismo sujeto y, por tanto, evaluar la progresión del impacto respiratorio, lo que para el estudio de las RS y parámetros inflamatorios de origen respiratorio inducidos por ejercicio en deportistas es relevante dado que el impacto del ejercicio en sujetos habitualmente expuestos a este tipo de estímulo puede que no sea identificable en forma temprana o inmediatamente posterior al ejercicio.

La técnica de CAE es un método no invasivo de muestreo del fluido epitelial de la vía aérea y territorio alveolar (Ahmadzai et al., 2013). El CAE está compuesto principalmente por agua (>99%) y por moléculas que actúan como biomarcadores relacionados a RS y/o procesos de inflamación tanto de origen respiratorio como sistémicos (Effros et al., 2002). A diferencia del lavado broncoalveolar o esputo inducido, las muestras de CAE no están compuestas por células, sin embargo, la concentración de los biomarcadores obtenidos si están directamente influenciados por estas células, con concentraciones variables en relación al cambio en la composición y actividad celular (Horváth et al., 2005; Dodig & Čepelak, 2013).

La literatura reporta que las RS y parámetros inflamatorios mayormente analizados en muestras de CAE son H₂O₂, eicosanoides (prostanoides (prostaglandinas, protaciclina, y tromboxano), leucotrienos, isoprostanos), productos relacionados con el NO• (ONOO•,

NO₂⁻, NO₃⁻), citoquinas y factores de crecimiento, aldehídos y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs), adenosina, metales de transición, ADN y miRNA, lactato, y pH (Horváth et al., 2005; Ahmadzai et al., 2013). Recientemente, Araneda et al (2016) publicaron una revisión sistemática donde se informan los marcadores en CAE que han sido evaluados en deportistas y/o considerando al ejercicio físico como estímulo en la producción de RS y/o inflamación pulmonar, siendo H₂O₂, NO₂⁻, pH, leucotrienos, interleuquinas, prostaglandinas, tromboxanos, TBARs, 8-isoprostano, MDA, y lactato (Araneda et al., 2016); siendo los más estudiados H₂O₂, NO₂⁻, y pH, y por tanto, los de interés en esta tesis.

1.8 RS y parámetros inflamatorios en muestras de CAE.

Como se mencionó previamente, el ejercicio físico afecta el estado redox respiratorio y puede inducir la formación de parámetros inflamatorios locales. La figura 6 muestra los factores involucrados en este fenómeno, el cual está sujeto a las características del ejercicio en sí mismo (ej. intensidad, duración, volumen), de las condiciones ambientales (ej. temperatura, humedad, altura, contaminación e irritantes respiratorios), y de las características propias del sujeto evaluado, en base a si el estímulo del ejercicio es considerado como algo “nuevo” o ya se encuentre “habitado”. En consideración a la metodología de los artículos que conforman esta tesis, se detallará las investigaciones que han evaluado mediante muestras de CAE en deportistas el efecto del ejercicio, con la finalidad de fundamentar el objetivo de los estudios realizados en virtud de aquellas preguntas aún sin respuesta en la literatura científica actual.

A través del análisis de muestras de CAE, Nowak et al. (2001) evaluó el efecto agudo del ejercicio a intensidad moderada en sujetos sanos que completaron un protocolo de ejercicio submáximo en cicloergómetro durante 6 minutos, no encontrando modificaciones en [H₂O₂] y [TBARs] (Nowak et al., 2001). En condiciones de normobaria (670 m) e hipobaria (2160 m), Araneda et al. (2005) evaluó a ciclistas competitivos posterior a un ejercicio breve pero máximo, no encontrando cambios en [H₂O₂], pero si en [MDA] afirmando que la lipoperoxidación por ejercicio ocurre en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (Araneda et al., 2005). Marek et al. (2009), en sujetos sanos posterior a la realización de diferentes ejercicios en cicloergómetro a distintas intensidades (60 y 120 vatios) reportó aumento en [H₂O₂], pero no de pH, infiriendo que la intensidad a la cual se realiza el esfuerzo es lo que afecta el estado redox

respiratorio (Marek et al., 2009). Similar aumento en $[H_2O_2]$ fue reportado previamente por Mercken et al. (2005) en sujetos sanos posterior a un esfuerzo máximo en cicloergómetro (Mercken et al., 2005). Posteriormente, Mareck et al. (2013) evaluó la influencia del frío sobre la producción inducida por ejercicio del mismo pro-oxidante ($[H_2O_2]$) en hombres sanos encontrando un aumento posterior a 50 minutos de ejercicio de alta intensidad (Marek et al., 2013). En corredores, Araneda et al. (2012) encontró aumento en $[H_2O_2]$ y $[NO_2^-]$ posterior a 21.1 y 42.2 kilómetros, junto con asociación entre ambas especies respiratorias reactivas. Con la finalidad de afirmar que los cambios en $[NO_2^-]$ fueron de origen respiratorio, los investigadores evaluaron $[NO_2^-]$ en plasma, no encontrando diferencias (Araneda et al., 2012). Asimismo, en sujetos sanos no habituados a correr, Araneda et al. (2014) encontraron aumento en $[H_2O_2]$ y $[NO_2^-]$ posterior a 10 km, sin inducir lipoperoxidación reflejado en la $[MDA]$ e inflamación local (pH_{CAE}) (Araneda et al., 2014). Al igual que en el estudio previo, se encontró asociación directa entre ambos marcadores, y entre sus cambios. Los resultados previos hacen inferir que, en sujetos sanos no habituados al ejercicio, el estímulo (ej. correr una distancia menor de 10 km) afecta el estado redox respiratorio, mientras que, en sujetos entrenados, la alteración redox ocurre a una mayor distancia. Así, aparece como interrogante si la $\dot{V}E$ total podría estar asociada en esta alteración. Esto lo demostró Tuesta et al (2016). al reportar que la duración del ejercicio ($\dot{V}E$ total) se relacionó con el aumento en $[H_2O_2]$ y $[NO_2^-]$, pero no en el pH_{CAE} de sujetos sanos no sedentarios posterior a 90 minutos de cicloergómetro a intensidad moderada (Tuesta et al., 2016).

De los datos reportados previamente se infiere que el ejercicio físico, y específicamente la $\dot{V}E$ total, desarrollado en condiciones ambientales de temperatura y humedad en rangos normales, afecta el estado redox tanto en sujetos sanos no entrenados como en habituados a entrenar, con la diferencia que el estímulo en estos últimos debe ser mayor para observar el efecto. Ahora bien, respecto al impacto en marcadores inflamatorios en muestras de CAE la literatura no es categórica en sus resultados. Así, Riedicker et al. (2007) encontraron un aumento en el pH_{CAE} en sujetos sanos posterior a 30 minutos de ejercicio de intensidad moderada (60% de FC máxima) (Riediker & Danuser, 2007); mientras que Pedersen et al. (2009) en nadadores posterior a 45 minutos de natación a similar intensidad no encontró cambios (L. Pedersen et al., 2009), al igual que Bikov et al. (2014) en sujetos sanos, este último, eso sí, encontró que en pacientes con asma, es decir, con alteración previa del estado redox, el ejercicio disminuyó el pH_{CAE} (Bikov et al., 2014). También se ha estudiado leucotrienos en CAE (ej. $[Cys-LTs]$), no

encontrando cambios en sujetos sanos posterior a 6 minutos de correr a alta intensidad (80-90% de FC máxima) (Bikov et al., 2010), pero sí en deportistas no habituados a correr (ej. judokas) al realizar esfuerzo máximo posterior a la evaluación de $\dot{V}O_2$ -máx. (Pucsok et al., 2007). La influencia de inhalación de irritantes respiratorios como el cloro y sus bioderivados también ha sido estudiado. Si bien Pedersen et al. (2009) y Font-Ribera et al. (2010) no encontraron cambios (L. Pedersen et al., 2009; Font-Ribera et al., 2010), Morrisette et al. (2016) describieron aumento en [8-isoprostano] cuando el ejercicio se realizó a mayor intensidad (Morissette et al., 2016). Por otra parte, respecto a las adaptaciones inducidas por el desarrollo crónico de ejercicio físico, existe sólo un reporte donde no se encontró diferencias entre biatletas y sujetos sanos sedentarios en $[H_2O_2]_{CAE}$ y [8-isoprostanos] $_{CAE}$ posterior a 6 semanas de entrenamiento moderado en altura (2800 msnm). Los investigadores encontraron niveles elevados aún después de vuelta a normobaría, sosteniendo que más que el ejercicio, es la condición donde se realiza el factor que mayormente desencadena los cambios (Heinicke et al., 2009).

Si bien la información previa permite aseverar que el ejercicio físico induce respuestas agudas que afecta el estado redox e inflamación respiratoria, según la revisión de literatura realizada, no existen reportes en humanos que hayan evaluado en muestras de CAE antioxidantes respiratorios, por lo que no se puede aseverar aún que este desbalance redox induce estrés oxidativo. Utilizando el modelo animal sí existen resultados interesantes en este sentido. Así, en ratas posterior a una hora de ejercicio agudo de intensidad moderada se encontró aumento en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), sin cambios en la glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Hatao et al., 2006); hallazgos similares fueron reportados por Lin et al. (2005) posterior a ejercicio intenso (30 minutos de correr en cinta con 10% inclinación) con aumento en SOD y glutatión reductasa (GR), pero sin cambios en CAT y GSH-Px (Lin et al., 2005). Un tipo de ejercicio habitual en el modelo animal es la natación, así en ratas Reddy et al. (1998) encontraron aumento en SOD y glutatión transferasa (GST), pero en aquellas que llegaron a la fatiga hubo disminución en GSH-Px (Reddy et al., 1998). Aumento en CAT en ratas que nadaron 20 minutos (intensidad moderada) fue reportado por Prigol et al. (2009) (Prigol et al., 2009). Los datos previos nos informan que, en el modelo animal, la actividad de los antioxidantes enzimáticos cambia dependiendo de las características del ejercicio físico, aumentando en aquellos de intensidad leve a moderado, y disminuyendo en los de alta intensidad o que inducen la fatiga.

También en el modelo animal, los antioxidantes no enzimáticos se han estudiado en lo respectivo a la respuesta frente al desarrollo agudo de ejercicio físico. En caballos se ha reportado aumento de ácido úrico después de 50 minutos de ejercicio incremental (Kirschvink et al., 2010). En ratas, ejercicio de moderada a alta intensidad (75% $\dot{V}O_2$ -máx.) no indujo cambios en el GSH (Lin et al., 2005), y en aquellas que realizaron ejercicio máximo hasta la fatiga hubo una disminución de GSH (Al-Hashem, 2012). Es decir, el comportamiento de los antioxidantes respiratorios no enzimáticos sigue un patrón de cambios similar a los enzimáticos, en donde las características del ejercicio van a condicionar los cambios, haciendo más susceptible a estrés oxidativo cuando la intensidad del ejercicio agudo es alta.

También han sido evaluados los cambios de la actividad antioxidante respiratoria posterior al entrenamiento físico, en virtud de evaluar los cambios inducidos por el desarrollo de ejercicio crónico. En este sentido, Reis Goncalves et al. (2012) encontraron aumento en la expresión de SOD en ratones posterior a 5 semanas de entrenamiento a intensidad moderada (Reis Gonçalves et al., 2012). Hallazgo similar encontró Olivo et al. (2014) posterior a 4 semanas de entrenamiento moderado (Olivo et al., 2014), y Altan et al. (2009) posterior a 9 semanas de entrenamiento en normobaria, pero no en hipobaria (3000 msnm) (Altan et al., 2009). También se ha encontrado un aumento en CAT posterior a 12 semanas de entrenamiento moderado (Da Cunha et al., 2013); y Menegali et al. (2009) encontraron aumento en SOD y CAT posterior a 8 semanas de natación moderada (Menegali et al., 2009). Estos hallazgos sostienen la idea de que el entrenamiento físico moderado induce adaptaciones en antioxidantes respiratorios que protegen posibles alteraciones redox en animales habituados a entrenar que realicen una prueba o protocolo de ejercicio intenso. Como se comentó previamente, en humanos no existen reportes que permitan sustentar el mismo comportamiento, por lo que desarrollar nuevas investigaciones son necesarias con la finalidad de evaluar además de la producción de especies reactivas, la capacidad de los antioxidantes en evitar el daño oxidativo asociado al desbalance redox respiratorio.

1.9 Valoración del trabajo respiratorio (*work of breathing*, WOB).

En la relación existente entre ejercicio y producción de RS y parámetros inflamatorios respiratorios, la literatura muestra asociación directa con la $\dot{V}E$ total desarrollada en los protocolos de ejercicio (Araneda et al., 2012, 2014, 2016; Tuesta et al., 2016). Para movilizar mayor $\dot{V}E$ durante el ejercicio es necesaria una adecuada activación contráctil de la musculatura respiratoria (ej. *m. diafragma*, *m. intercostales*, etc.). Así, el trabajo de la respiración (*work of breathing*, WOB) es importante que sea evaluado objetivamente con el propósito de explorar estrategias ventilatorias que optimicen la $\dot{V}E$ frente al mismo estímulo de ejercicio, evitando así, la posible mayor alteración del estado redox respiratorio. Con el objetivo de ampliar las mediciones no invasivas relacionadas al estudio del efecto del ejercicio físico sobre el estado redox respiratorio, en esta tesis se desarrolló una investigación relacionada a la confiabilidad de la medición objetiva del WOB en deportistas mediante dispositivos no invasivos que registran localmente la saturación muscular de oxígeno a través del principio de espectroscopía de ondas cercanas al rango infrarrojo (*Near-Infrared Spectroscopy*, NIRS). A continuación, se presenta en forma resumida el contexto teórico en el cual se engloba el objetivo de la investigación.

En reposo, el consumo de oxígeno ($\dot{V}O_2$) asociado a la respiración en adultos sanos se estima corresponda al 2% del total (Mortola, 2019), aspecto atribuido esencialmente al WOB. En ejercicio físico y como consecuencia del incremento en $\dot{V}E$, el WOB aumenta al $8.8 \pm 3.3\%$ del $\dot{V}O_2$ -máx. en sujetos entrenados (Vella et al., 2006), 10 al 15% en sujetos físicamente inactivos (Aaron et al., 1992), y entre el 30 al 45% en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas (ej. EPOC y fibrosis pulmonar) (Bell et al., 1996; Levison & Cherniack, 1968). El incremento del WOB producto del ejercicio físico conlleva mayor entrega de flujo sanguíneo y O_2 en la musculatura respiratoria, pudiendo aminorar la entrega de nutrientes y metabolitos en musculatura locomotora y con ello causar fatiga e intolerancia al esfuerzo y detención temprana del ejercicio físico (Dempsey et al., 2006; Dominelli et al., 2017).

Con la finalidad de registrar los niveles de O_2 en el tejido muscular, diversos dispositivos portátiles se han utilizado en grupos musculares superficiales logrando por medio de la interpretación de valores de longitud de onda cercana al rango infrarrojo (NIRS) valorar la SmO_2 de manera sencilla y no invasiva (Boushel et al., 2001; Scheeren et al., 2012). En las ciencias del deporte, la SmO_2 principalmente se ha evaluado en musculatura locomotora (ej. *m.vastus laterallis* and *m.tibialis anterior*) (Perrey & Ferrari, 2018)

con valores adecuados de validez (Mancini et al., 1994) y confiabilidad (Thiel et al., 2011; Crum et al., 2017), permitiendo ampliar su aplicabilidad a la prescripción de intensidad óptima de trabajo en programas de rehabilitación y entrenamiento físico (Iannetta et al., 2017; Perrey & Ferrari, 2018). Si bien la SmO_2 de musculatura locomotora es una importante variable a considerar para mejorar el rendimiento físico del deportista, su valor puede condicionarse a la demanda energética de la musculatura respiratoria asociada al WOB durante el esfuerzo físico (Romer et al., 2006), aspecto que varía entre diferentes disciplinas deportivas (Power et al., 2012), y patrón ventilatorio desarrollado por el deportista (Naranjo et al., 2005; Legrand et al., 2007), razón que motiva el interés de evaluar el comportamiento de SmO_2 en musculatura respiratoria durante el ejercicio físico. Lo anterior, sumado a que dentro de las variables respiratorias que se han asociado a cambios en las RS y parámetros inflamatorios inducidos por ejercicio se encuentra la $\dot{V}E$, hace necesario contar con mediciones que permitan objetivar el WOB asociado al incremento en $\dot{V}E$ para evaluar si el patrón ventilatorio adoptado durante el ejercicio puede estar relacionado con el impacto sobre el balance redox respiratorio (Araneda et al., 2012, 2014, 2016; Tuesta et al., 2016). Al respecto, existen estudios que han evaluado la SmO_2 en músculos inspiratorios en diferentes condiciones de aumento del WOB tanto en atletas como pacientes (Kowalchuk et al., 2002; Vogiatzis et al., 2009, 2010; Tanaka et al., 2018), y si bien las conclusiones son similares en torno a la existencia de desoxigenación a medida que aumenta la intensidad de ejercicio, según la búsqueda de información realizada no existen estudios que informen del grado de concordancia de los valores de SmO_2 en músculos inspiratorios, aspecto relevante dado la existencia de heterogeneidad en el patrón ventilatorio adquirido durante el ejercicio intra e inter-sujetos; como tampoco respecto a la asociación entre el WOB en ejercicio y la alteración del balance redox y/o inflamación respiratoria inducida por ejercicio. Por lo que explorar este ámbito resulta interesante en virtud de caracterizar los factores involucrados en la producción de RS en deportistas.

2. Objetivos

2 Objetivos

La información presentada previamente respecto al efecto del ejercicio sobre el estado redox respiratorio en humanos es consistente en demostrar que el impacto sobre la producción de RS dependerá de características de sujeto de estudio (habitado o no al ejercicio físico), ejercicio (tipo, modo, duración e intensidad), técnica seleccionada para recolectar las muestras (lavado broncoalveolar, fibrobroncoscopia, esputo inducido, aire espirado, y condensado de aire espirado), y RS seleccionadas a evaluar (H_2O_2 , NO^\bullet , pH, NO_2^- , 8-isoprostanos, MDA, etc.); siendo la mayoría de los estudios en condiciones ambientales controladas y no causales o relacionadas con el efecto del ejercicio, aspecto que lamentablemente no representan las condiciones habituales donde se realiza la práctica deportiva. Así, para evaluar la influencia de ciertas condiciones ambientales sobre la producción inducida por ejercicio de RS y parámetros inflamatorios respiratorios, se han propuesto los siguientes objetivos:

2.1 Objetivo 1 (Artículo científico 1).

Comparar cómo deportistas crónicamente expuestos a irritantes respiratorios (cloro y bioderivados) cambian el estado redox del sistema respiratorio al realizar dos ejercicios distintos (el acuático habitual y otro terrestre) de igual duración e intensidad.

2.2 Objetivo 2 (Artículo científico 2).

Determinar la influencia de la humedad relativa sobre los cambios inducidos por ejercicio físico en el estado óxido-reducción del sistema respiratorio.

2.3 Objetivo 3 (Artículo científico 3).

Evaluar la confiabilidad de la valoración de oxigenación en músculos respiratorios (*m.intercostales*) a través de la medición no invasiva y portátil durante el ejercicio físico máximo en deportistas.

3.

Informe de los directores

3 Informe de los directores.

El doctor Ginés Viscor Carrasco y el doctor Oscar Araneda Valenzuela, como directores de la Tesis Doctoral presentada por Felipe Contreras Briceño, hacen constar que el doctorando ha participado activamente en los artículos que forman esta memoria, tal como queda reflejado en el orden y composición del equipo de autores de cada uno de ellos. El doctorando ha tenido un papel fundamental en el diseño experimental y el tratamiento de los datos. También ha tenido un importante papel en el proceso de difusión y publicación de los resultados y conclusiones, es decir, en la redacción de los manuscritos y en el proceso de revisión por pares.

Los factores de impacto de las revistas donde se han publicado, aceptado y enviado los artículos que conforman esta tesis son los siguientes:

Artículo científico I.

Título: *Swimming versus running: effects on exhaled breath condensate pro-oxidants and pH.*

Autores: Araneda, OF; Contreras-Briceño, F; Cavada, G & Viscor, G.

Revista: *European Journal of Applied Physiology.*

Año: 2018; Volumen: 118; Número: 11; Páginas: 2319 - 2329

PMID: 30094648

DOI: 10.1007/s00421-018-3958-0

JCR Impact Factor (2018): 3.055

Q1 Sports Science

JCR 5 Years IF:

3.060

Participación del doctorando: Elaboración del diseño de investigación y protocolo de ejercicio. Reclutamiento de los participantes. Ejecución del estudio. Obtención de las muestras. Responsable del almacenamiento, la preparación, procesamiento y análisis de las muestras. Análisis estadístico de los resultados y elaboración de los gráficos. Tratamiento de los resultados. Participación en la discusión y conclusiones. Redacción del manuscrito y discusión en el proceso de revisión.

Artículo científico II.

Título: *Humidity prevents the exercise-induced formation of hydrogen peroxide and nitrite in exhaled breath condensate in recreational cyclist.*

Autores: Contreras-Briceño, F; Espinosa-Ramírez, M; Viscor, G & Araneda, OF.

Revista: *European Journal of Applied Physiology.*

Año: 2020; Volumen: 120; Número: 10; Páginas: 2339 - 2348

PMID: 32772245

DOI: 10.1007/s00421-020-04456-9

JCR Impact Factor (2018): 3.055

Q1 Sports Science

JCR 5 Years IF:

3.060

Participación del doctorando: Elaboración del diseño de investigación y protocolo de ejercicio. Reclutamiento de los participantes. Ejecución del estudio. Obtención de las muestras. Responsable del almacenamiento, la preparación, procesamiento y análisis de las muestras. Análisis estadístico de los resultados y elaboración de los gráficos. Tratamiento de los resultados. Participación en la discusión y conclusiones. Redacción del manuscrito y discusión en el proceso de revisión.

Artículo científico III.

Título: *Reliability of NIRS portable device for measuring intercostal muscles oxygenation during exercise.*

Autores: Contreras-Briceño, F; Espinosa-Ramírez, M; Hevia, G; Llambias, D; Carrasco, M; Cerda, F; López-Fuenzalida, A; García, P; Gabrielli, L & Viscor, G.

Revista: *Journal of Sports Science*

Año: 2019; Volumen: 37; Número: 23; Páginas: 2653 - 2659

PMID: 31419921

DOI: 10.1080/02640414.2019.1653422

JCR Impact Factor (2018): 2.811

Q1 Sports Science

JCR 5 Years IF: 3.264

Participación del doctorando: Elaboración del diseño de investigación y protocolo de ejercicio. Reclutamiento de los participantes. Ejecución del estudio. Obtención de las muestras. Responsable del almacenamiento, la preparación, procesamiento y análisis de las muestras. Análisis estadístico de los resultados y elaboración de los gráficos. Tratamiento de los resultados. Participación en la discusión y conclusiones. Redacción del manuscrito y discusión en el proceso de revisión.

Firmado:

A handwritten signature in green ink, featuring a circular loop and several intersecting lines.

Dr. Ginés Viscor Carrasco

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, sweeping loop followed by a series of smaller, connected strokes.

Dr. Oscar Araneda Valenzuela

4. Publicaciones científicas

4 Publicaciones científicas.

4.1 Artículo científico I

Swimming versus running: effects on exhaled breath condensate pro-oxidants and pH. (2018). Araneda, OF¹; Contreras-Briceño, F^{2,3}; Cavada, G⁴ & Viscor, G². *European Journal of Applied Physiology*, 118 (11): 2319 - 2329.

Affiliations:

¹ Laboratorio de Fisiología Integrativo de Biomecánica y Fisiología Integrativa (LIBFE), Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile.

² Laboratory of Exercise Physiology, Department of Health of Science, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

³ Physiology Section, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁴ School of Public Health, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

PMID: 30094648 DOI: 10.1007/s00421-018-3958-0

European Journal of Applied Physiology
<https://doi.org/10.1007/s00421-018-3958-0>

ORIGINAL ARTICLE



Swimming versus running: effects on exhaled breath condensate pro-oxidants and pH

Oscar F. Araneda¹ · Felipe Contreras-Briceño^{2,3} · Gabriel Cavada⁴ · Ginés Viscor³

Received: 18 May 2018 / Accepted: 31 July 2018
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose The respiratory redox-state of swimmers can be affected by chronic exposures to chlorinated pools, and the effects of different exercises on it are unknown. Our aim was to compare two exercises performed at high-intensity and under habitual environmental conditions (swimming indoor vs. running outdoor) on the production of pro-oxidants (hydrogen peroxide and nitrite) and pH in exhaled breath condensate (EBC) and spirometry parameters in competitive swimmers chronically exposed to chlorinated pools.

Methods Seventeen men and women (mean age \pm SD = 21 ± 2 years) swam 3.5 km in an indoor pool treated with Cl_2 , and after 2-weeks, they ran 10 km outdoors. The pH_{EBC} , $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$, $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$, $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ and spirometry parameters were analyzed pre-exercise and 20 min and 24 h after exercise ended.

Results Two mixed models were applied to compare EBC parameters between swimming and running. Lower levels of $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.008$ and $p = 0.018$, respectively) were found 24-h post-swimming, and the same trend was observed for $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ ($p = 0.062$). Correlations were found in both exercises between pre-exercise levels of pH_{EBC} , $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$, $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$, and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ and their changes (Δ) after 24-h as well as between $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ for basal levels and for changes after 24 h. A relationship was also found for running exercise between pulmonary ventilation and changes after 24 h in $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$. Spirometry data were unaffected in both types of exercise.

Conclusion In competitive swimmers, at 24-h acute post-exercise follow-up, swimming decreased and running increased pro-oxidant biomarkers of pulmonary origin, without changes in lung function.

Keywords Exercise · Exhaled breath condensate · Oxidative stress · Spirometry.

Communicated by I. Mark Olfert.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00421-018-3958-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Oscar F. Araneda
 ofaraneda@miuandes.cl

- ¹ Laboratorio de Fisiología Integrativo de Biomecánica y Fisiología Integrativa (LIBFE), Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile
- ² Laboratory of Exercise Physiology, Department of Health of Science, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile
- ³ Physiology Section, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁴ School of Public Health, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Abbreviations

DBP	Derived by-products
EBC	Exhaled breath condensate
H_2O_2	Hydrogen peroxide
NO_2^-	Nitrite anion
$\dot{V}\text{O}_2 \text{ max}$	Maximal oxygen consumption

Introduction

Regular physical exercise is essential for maintaining health; however, it affects the redox state mainly at the muscular level (Finaud et al. 2006) because it induces fatigue when the metabolic demand affects contractile function (Powers and Jackson 2008). In the respiratory system, the redox state is also altered due to the increased pulmonary ventilation (Araneda et al. 2012), airway dehydration (Freed and Davis 1999), temperature and humidity (Marek et al. 2013), altitude (Araneda and Tuesta 2012) and pollution (Carlisle and Sharp 2001), among

Published online: 09 August 2018

Springer

other factors. Swimming in indoor pools has been beneficial for patients with asthma, as the warm and humid environment decreases airway dehydration and exercise-induced bronchospasm (Goodman and Hays 2008). The use of chlorine (Cl_2) is common for maintaining the microbiological quality of the water. In this regard, the literature has reported lung damage due to the high concentrations of Cl_2 and derived by-products (DBP) (Martin et al. 2003; White and Martin 2010). Likewise, normal concentrations in swimming pools have been related to allergic phenomena (Font-Ribera et al. 2011), increased permeability of the respiratory epithelium (Carbonnelle et al. 2002), increased pro-oxidants (Font-Ribera et al. 2010; Morissette et al. 2016), and inflammation of the airway (Pedersen et al. 2009). A non-invasive way to study the changes in the redox state of the airway is to analyse the exhaled breath condensate (EBC) (Liang et al. 2012). Thus, our study group has observed an increase in hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) using EBC in subjects trained at high altitude (Araneda et al. 2005) as well as in long-distance runners (21.1 and 42.2 km), adding to the increased pro-oxidants a tendency towards acidification of the airway (a phenomenon associated with pulmonary inflammation) (Araneda et al. 2012). Indoor swimming pools have normal concentrations of Cl_2 (0.5–2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, free chlorine) (Drobnic et al. 1996), and few studies have evaluated the impact of physical exercise on swimmers through EBC. Using this method, Font-Rivera et al. (2010) did not observe any change in 8-isoprostane (8-Iso-P) in healthy adults after swimming for 40 min. Nevertheless, another study reported increases of $[8\text{-Iso-P}]_{\text{EBC}}$ in competitive swimmers after swimming for 105 min at mild–moderate intensity that were inversely associated with changes in spirometry parameters (Morissette et al. 2016).

In subjects with chronic exposure to respiratory irritants such as Cl_2 and DBP, as in the case of competitive swimmers, the available evidence is not yet categorical on the effect of exercise on pulmonary redox state. Thus, the aim of this study was to compare a 3.5-km swim in an indoor chlorine-treated pool with a 10-km outdoor run on the production of pro-oxidants (hydrogen peroxide and nitrite) and pH in exhaled breath condensate (EBC) and spirometry parameters in competitive swimmers chronically exposed to chlorinated pools. Both exercises were performed at high-intensity and under the usual environmental conditions. The 10-km run exercise protocol has been previously described by our group and their effect on the respiratory redox-state has been characterized (Araneda et al. 2012, 2014).

Methods

Participants

Seventeen competitive university swimmers with no history of asthma or respiratory infection for at least 2 months prior to measurements were included. Participants did not consume anti-inflammatory drugs, antioxidants, or any other nutritional supplement (Table 1). All participants were informed orally and in writing about the study before signing the informed consent form. The protocol was in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki concerning experimental research on humans, and the study was approved by the Ethics Committee of the University of Los Andes (FONDECYT project #11130082 framework).

Protocol

The evaluations included the following: (1) anamnesis interview about swimming experience (years, training volume) and presence of post-swimming irritation signs; (2) anthropometric assessments (Rosscraft™, CA, USA); (3) determination of maximal oxygen consumption ($\dot{V}\text{O}_2$ max) on a treadmill ergometer (HP Cosmos™, Traunstein, Germany) to voluntary exhaustion, despite verbal encouragement (respiratory exchange ratio 1.20 ± 0.05). $\dot{V}\text{O}_2$ max was calculated as the highest 30 s value achieved during the maximum-effort incremental test and is considered a valid index of $\dot{V}\text{O}_2$ max in subjects exercising to their limit of exercise tolerance (Day et al. 2003). Respiratory data were breath-by-breath analysed using open-circuit spirometry and

Table 1 Participant characteristics

Age (year)	21 ± 2
M/F	11/6
Post-swimming irritation signs (n, %)	14–82.3
Rhinitis	7–41.1
Dermatitis	6–35.2
Eye irritation	8–47.0
Cough	5–29.4
Body weight (BW, kg)	69 ± 11
Height (cm)	172.2 ± 9.1
BMI ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	23.2 ± 2.0
Swimming experience (yr)	9.4 ± 4.2
Training volume ($\text{m}\cdot\text{week}^{-1}$)	16647 ± 5711
$\dot{V}\text{O}_2$ max ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	3452 ± 797
$\dot{V}\text{O}_2$ max ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$)	49.9 ± 8.9

Other data are reported as the mean ± SD

$\dot{V}\text{O}_2$ max was measured in a treadmill test

M/F, male/female

expressed at STPD conditions (MasterScreen CPX, Jaeger™, Germany). Before every test, the gas analyser and volume transducer were calibrated according to the manufacturer's instructions. Participants were instructed to avoid strenuous exercise and alcohol consumption within 24 h before the test and caffeinated beverages and meals within 3 h before the test.

To correlate the changes of the EBC parameters with the exchange of pulmonary ventilation, the total ventilation during the race was estimated. Thus, the mean individual heart rate was used in the field test to extrapolate the minute ventilation obtained in the laboratory maximal test and multiply it by the total time of the running race.

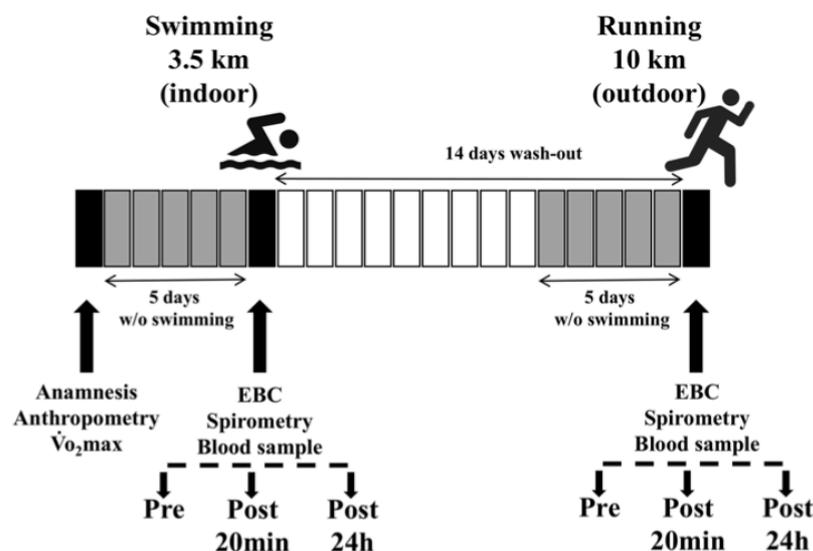
Subsequently, to reduce exposure to inhalation of Cl₂ and DBP, all participants refrained from any training, including swimming, for 5 days prior to physical testing. Both tests were performed between 08:00 a.m. and noon, at least 1 h after intake of a light breakfast. After the physical tests were completed, participants could only hydrate themselves with isotonic drinks free of stimulants, antioxidants and/or anti-inflammatory substances and with their usual diet regime. The participants were instructed to complete the distances of both exercises in the shortest possible time, keeping their heart rate range between 80 and 90% of the maximum theoretical value for their age. To ensure that exercises were completed at this intensity, all participants used a portable heart rate monitor and could freely see its individual value at any moment. First, all participants swam 3.5 km in a 25-m long indoor swimming pool, freestyle crawl (typically, 1 breath every 2–3 strokes). The environmental and water characteristics of the pool were simultaneously recorded. Water

samples were obtained from different pool points using sterile flasks, immediately stored in liquid nitrogen and subsequently at – 80 °C until a further analysis by HPLC was performed (Waters 1515 isocratic HPLC Pump, Waters 717 plus autosampler, Waters 2487 Dual absorbance detector, Waters Co., Milford, MA, USA). After a wash-out period of 14 days, including 5 without swimming, the second physical exercise test was performed consisting of a 10-km outdoor running in a 1-km circuit. The atmospheric conditions were simultaneously recorded for the exercise test, and air quality data were obtained from the MACAM environmental monitoring network. The environmental conditions of both exercises are given in Online Resource 1.

In each physical test, three measurement stages were performed: (1) pre-exercise (pre); (2) after 20 min (20 min-post); and (2) after 24 h (24 h-post). Each measurement stage was done in laboratory under environmentally controlled conditions (ambient temperature 20 °C, relative humidity 50%) and consisted of a spirometry test, collection of exhaled breath condensate (EBC), and a venous blood sample. Figure 1 shows a scheme of the experimental design.

Immediately after arrival at the laboratory, participants started the EBC collection, while a medical professional obtained a blood sample. The time between completing the exercise test and starting EBC collection was never less than 20 min. The spirometry test was done immediately after the end of EBC sample collection. For spirometry testing, a portable spirometer ML3500 model (Carefusion™, San Diego, USA) was used, based on criteria established by the American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS) (Miller et al.

Fig. 1 Study design scheme



2005). The reference values from Knudson et al. (1983) were used to interpret the results (see Table 2).

To obtain EBC samples, the exhaled breath was cooled and condensed through a previously validated instrument (Valenzuela and Encina 2009). Participants remained at rest, wore swimming nose clips, and cleaned their mouths with distilled water before starting. Right away, they were asked to breathe at a tidal volume for approximately 15 min or until obtaining an EBC volume of 1.5 mL. The equipment used has a saliva receptor to prevent any contamination with other mediators present in the mouth. Duplicates were obtained for all EBC samples and were immediately stored in liquid nitrogen and then at -80°C until further analysis. Approximately 4–5 mL of venous blood was collected from each participant using heparinized blood tubes (BD Vacutainer System, Plymouth, UK) and through radial vein puncture. Immediately after each blood sample was collected, centrifugation for 10 min at 3000 rpm was performed to obtain separation between plasma and cellular components. Duplicates were obtained for all plasma samples and were stored in liquid nitrogen and then at -80°C until further analysis.

Hydrogen peroxide in EBC

The $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in EBC was measured using a FOX2 reagent (Nourooz-Zadeh et al. 1994). This reagent contains Fe^{+2} (250 μM), which in an acidic medium (HClO_4 , 110 mM) is oxidized to Fe^{+3} by the presence of H_2O_2 . The amount of H_2O_2 is monitored through the reaction between the ferric ion and the xylenol orange indicator (250 μM). Sorbitol (100 mM) was added to the original reagent according to Gay and Gebicki (Gay and Gebicki 2002); this method has previously been used by our research group (Araneda et al. 2012, 2014). For measurements, 350 μL of EBC and 150 μL of modified FOX2 were taken, and then the sample was incubated for 1 h at room temperature and absorbance was read at 560 nm on a microplate spectrophotometer (EPOCHTM, BioTek Instruments, USA). Three calibration curves were performed for each measurement group using H_2O_2 (Merck) as a standard.

pH in EBC

The pH was measured using the protocol from Paget-Brown et al. (2006). One hundred microliters of EBC were bubbled with argon for 8 min at a flow rate of $350\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, and pH was later measured using a $3\times 38\text{ mm}$ (diameter \times length) microelectrode (Cole and Palmer) connected to a pH metre (OaktonTM Acorn pH 6).

Nitrites in EBC and plasma

The $[\text{NO}_2^-]$ was measured using a spectrophotometric test based on the Griess reaction (Green et al. 1982). Griess reagent (300 μL ; 0.1% naphthylethylenediamine-dihydrochloride, 1% sulphanilamide, 3% H_3PO_4) was added to 300 μL of EBC or plasma, previously deproteinized with $\text{NaOH}/\text{ZnSO}_4$. The mixture was incubated for 10 min, and absorbance was measured at 550 nm. Three calibration curves were performed for each group's measurements using sodium nitrite (Merck) as a standard.

Statistical analyses

To evaluate the normal distribution of the data, the Shapiro–Wilk test was applied. The values of ambient temperature, relative humidity, intensity and time for the swimming and running tests were compared using unpaired Student's *t* test. Spirometry values were analysed using the one-way RM ANOVA test. The parameters measured in EBC and plasma, given their high intrinsic variability, were analysed using a linear mixed model for relative values. The mixed model is a statistical model containing both fixed effects and random effects. They are particularly useful in settings where repeated measurements are made on the same statistical units (longitudinal studies) or where measurements are made on clusters of related statistical units, as in this case. Because of their advantage in dealing with missing values, mixed effects models are often the first choice over conventional approaches, such as RM ANOVA. The trends in the curves for the various parameters over time were compared for swimming and running using the mixed model analysis. For this purpose, model 1 was designed as follows:

$$\gamma = 1 + \beta_1 \cdot t + \beta_2 \cdot g + \beta_3 \cdot t \cdot g$$

Table 2 Spirometry parameters

	Swimming			Running		
	Pre	0.33 h post	24 h post	Pre	0.33 h post	24 h post
FEV ₁ , L	4.29 ± 0.78	4.44 ± 0.82	4.30 ± 0.78	4.25 ± 0.74	4.38 ± 0.81	4.25 ± 0.70
FVC, L	5.04 ± 1.05	5.03 ± 1.01	4.97 ± 1.00	5.00 ± 1.04	4.99 ± 0.95	4.95 ± 0.97
FEV ₁ /FVC, %	86.0 ± 7.5	88.8 ± 6.0	86.8 ± 4.4	85.7 ± 7.5	88.0 ± 5.8	86.3 ± 5.2
FEF _{25–75} , L·s ⁻¹	4.76 ± 1.37	5.24 ± 1.33	4.76 ± 1.11	4.64 ± 1.33	5.05 ± 1.33	4.63 ± 1.04

Data are reported as the mean \pm SD

where “ t ” represents time, “ g ” the exercise performed and “ $t \cdot g$ ” their interaction; when this parameter is significant, the trends between the two tests are different. To include the times in which potential differences between the physical tests could be found, an analysis of variance for repeated measures was integrated. Thus, model 2 was designed as follows:

$$\gamma = 1 + \beta_1 \cdot t_2 + \beta_2 \cdot t_3 + \beta_4 \cdot g \cdot t_2 + \beta_5 \cdot g \cdot t_3$$

where “ t_2 ” and “ t_3 ” represent the post-exercise times of 20 min and 24 h, respectively. The variable “ g ” corresponds to the type of exercise performed, and the products “ $g \cdot t_2$ ” and “ $g \cdot t_3$ ” to their interactions.

For the parameters measured in EBC, the average and the range of intra-day variation coefficients were calculated from the pre-exercise values of the two physical tests for any subject. Stata 14.0 statistical software was used for statistical analysis (Stata Corp., TX, USA). GraphPad Prism 6 software was used for the construction of graphs (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

Results

No differences in environmental temperature ($p = 0.299$) or relative humidity ($p = 0.207$) were found between the two tests, and both values were adequate for the development of physical exercise; in turn, the concentration of free and combined Cl_2 in the swimming pool was found to be in the normal range. When the running took place, the levels of air pollutants were below the maximum limits according to the Chilean Air Quality Standards (see Online Resource 1). Both exercises were performed at high intensity, with an average heart rate (bpm) of 157 ± 13 (79.3 ± 7.0 , % HR_{max}) and 165 ± 12 (83.6 ± 5.8 , % HR_{max}) for swimming and running, respectively ($p = 0.980$). No changes in time (seconds) between the tests ($p = 0.890$) were observed, therefore, the swimming lasted 3260 ± 286 s and the running 3068 ± 471 s.

In the spirometry measurements (see Table 2), no differences were found in the swimming test for FEV_1 ($p = 0.816$), FVC ($p = 0.978$), FEV_1/FVC ($p = 0.400$) or FEF_{25-75} ($p = 0.459$); no differences were found in the running trial for FEV_1 ($p = 0.835$), FVC ($p = 0.987$), FEV_1/FVC ($p = 0.566$) or FEF_{25-75} ($p = 0.540$).

The average absolute values of pH and pro-oxidants in EBC showed great variability and tendency towards higher values in the pre-exercise (pre) stage when participants swam (see Online Resource 2), so the relative values in relation to the baseline values were used for the statistical evaluation. The analysis of the trends using model 1 showed differences in $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.018$). Thus, compared to swimming, in running, an increase was observed that shows a decrease

over time. For $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.008$) and the relationship between $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ ($p = 0.062$), the same behaviour of the curves was observed (see Fig. 2). No changes in $[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ ($p = 0.480$) or pH_{EBC} ($p = 0.728$) were found.

The comparison between physical test type at the same measurement stage using model 2 showed higher $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ 24 h after the participants ran ($p = 0.007$). A similar result ($p = 0.017$) was found in $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$. In blood, this metabolite did not show any difference based on physical test type. The relationship between $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ showed a tendency to increase in the 24 h post-running stage ($p = 0.061$). Finally, lower pH_{EBC} ($p = 0.002$) was observed

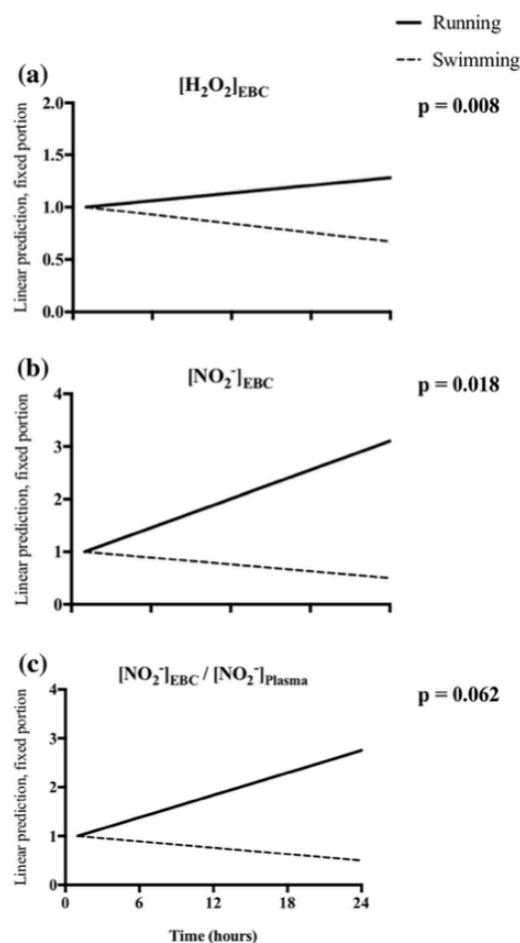


Fig. 2 Analysis of trends in pro-oxidants after a 10-km run (solid line) or a 3.5-km swim (dashed line) using mixed model 1. **a** Hydrogen peroxide in EBC. **b** Nitrite anion in EBC. **c** EBC/plasma nitrite ratio. The p value represents the difference between the two exercises tests after 24 h

in the 20 min post stage after participants swam, with no subsequent changes.

In both physical tests, correlations were found between the pre-exercise value and the absolute changes (Δ) calculated as [24-post]–[pre], for pH_{EBC} ($r = -0.58$, $n = 34$, $p \leq 0.001$), $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ ($r = -0.79$, $n = 34$, $p \leq 0.001$), $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($r = -0.74$, $n = 34$, $p \leq 0.001$), and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ ($r = -0.77$, $n = 34$, $p \leq 0.001$) (see Fig. 3).

Figure 3 shows the correlations between the absolute values of $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($r = 0.62$, $n = 34$, $p \leq 0.01$) (Fig. 3a) and between $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $\Delta[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($r = 0.72$, $n = 34$, $p \leq 0.01$), both in swimming and running (b). Finally, estimated total ventilation during running was correlated with $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ ($r = 0.53$, $n = 17$, $p = 0.028$), as seen in c. No significant correlations were observed with $\Delta[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.130$) and $\Delta\text{pH}_{\text{EBC}}$ ($p = 0.170$).

Discussion

In this research, competitive swimmers chronically exposed to chlorine and its derivatives had decreased $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$, $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$, and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ after swimming 3.5 km in a chlorinated indoor swimming pool in comparison to a similar workload effort of outdoor 10 km running, with no changes in the pH_{EBC} . When the participants ran, they showed higher values of $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ in the 24-h post-running stage and pH_{EBC} in the 20-min post-running stage when compared to the same times after swimming. Although differences between exercises regarding the pro-oxidants measured in EBC were found, the spirometry parameters were not modified.

Outdoor running and pro-oxidants in EBC

The 10 km outdoor running exercise increased $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$, which is a similar finding to that observed in a previous study conducted on active subjects not accustomed to running (Araneda et al. 2014). H_2O_2 is widely accepted as a biomarker of inflammatory processes and/or oxidative stress generated by the combination of O^- radicals and H^+ ions, a reaction accelerated by the superoxide dismutase enzyme. At the respiratory level, its potential sources of origin are pulmonary phagocytes, type II pneumocytes and airway epithelial cells (Liang et al. 2012). Very little research has analysed the $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ in exercise. Nowak et al. (2001) found no differences after cycle ergometer exercise (120 watts \times 6 min) in healthy subjects. A similar result was found after maximal exercise (3 min) in elite cyclists at an altitude of 670 m (similar to the present study) and 2,160 m (Araneda et al. 2005). In runners, few data are available in the literature evaluating $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$, therefore, the findings of this research are only comparable to previous research in

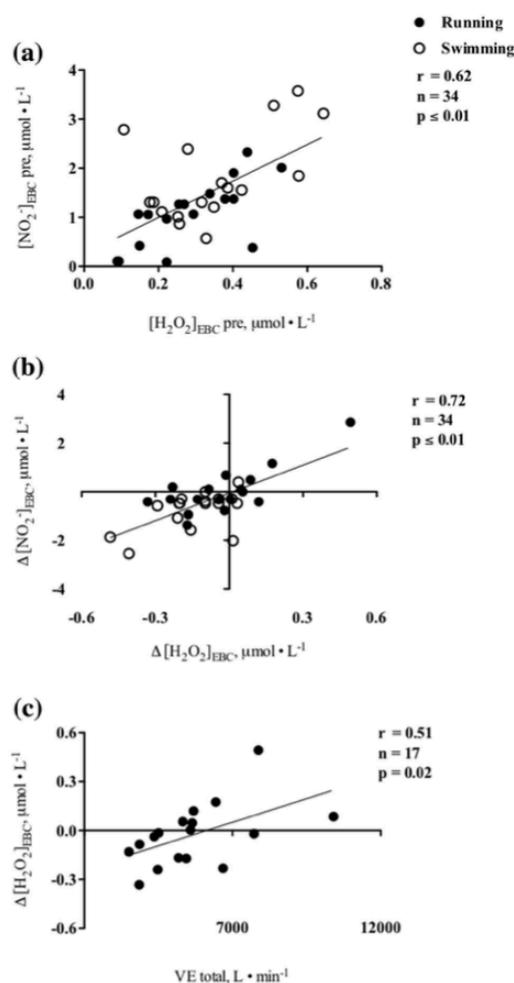


Fig. 3 Correlations between hydrogen peroxide and nitrites in exhaled breath condensate contents after a 10-km run (filled circles) or a 3.5-km swim (hollow circles) in **a** pre-exercise (pre) values and **b** absolute change (Δ) 24 h after the end of exercise. **c** The correlation between estimated total pulmonary ventilation (VE total) and changes after 24 h (Δ) in EBC hydrogen peroxide ($[\text{H}_2\text{O}_2]$) content after a 10-km run. The continuous line represents the linear regression equation for both exercise bouts

our group. In trained long-distance runners, we previously found an increase after 21.1 and 42.2 km (Araneda et al. 2012) as well as in healthy untrained subjects after 10 km (Araneda et al. 2014). Increases in this parameter have also been reported in patients with chronic respiratory diseases, such as COPD and asthma, pathologies characterized by an oxidative imbalance at the pulmonary level (Murata et al. 2014).

NO_2^- is a metabolite of nitric oxide (NO), which, given its stability, can feasibly be measured in exhaled breath (Liang et al. 2012). During exercise, it participates in bronchodilation to increase air flow and in vasodilation to avoid increases in pulmonary artery pressure; also, in pathological processes, NO_2^- alters the redox state by participating in inflammatory phenomena (Ricciardolo et al. 2004). To our knowledge, under exercise conditions, this marker has only been determined in EBC by our research group, where increases in trained runners after 21.1 and 42.2 km (Araneda et al. 2012) and in healthy untrained subjects after 10 km (Araneda et al. 2014) were found. To assess whether $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ could be perturbed by simultaneous increases in plasma, $[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ was also measured in this study, although no significant changes were found (see Online Resource 2). This finding suggests that the alteration of the redox state induced by outdoor running was a local phenomenon restricted to the pulmonary level, thus giving reliability to our model of physical exercise as an oxidant stimulus on the respiratory system.

Although participants were physically active subjects, they were not accustomed to outdoor running conditions. Thus, environmental variables such as temperature, relative humidity, and air pollutants could influence our data. In this regard, although the concentration of atmospheric contaminants was in the normal range (see Online Resource 1), previous studies have documented that inhalation of particulate matter (PM) and respiratory contaminants commonly present in ambient air (O_3 , NO_2 , SO_2 , CO) (Carlisle and Sharp 2001), in addition to increasing lung ventilation and changing the respiratory pattern (from nasal to buccal respiration), produce a deeper respiratory penetration of environmental irritants causing airway inflammation and oxidative stress (Huang et al. 2012) and, thus, decreasing sports performance (Pierson et al. 1986; Marr and Ely 2010). This phenomenon can even occur at low concentrations of pollutants (Lima et al. 2013), as was the case with this research. The ambient temperature and relative humidity could also be related to the running results. Although no differences in these parameters regarding swimming were found, the evidence suggests that a decrease in these variables promotes dehydration of the respiratory tract, which has been associated with alterations in the redox state at the pulmonary level (Marek et al. 2013). In addition, an increase in pulmonary ventilation, and with it a greater renewal of alveolar air, is another aspect that has been reported to be a stimulant for the formation of pro-oxidants at the pulmonary level (Freed and Davis 1999). Thus, the higher lung ventilation calculated for running in this research was associated with higher formation of $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ (see Fig. 3(c)), which is a finding previously described under laboratory conditions (Tuesta et al. 2016).

Indoor swimming and pro-oxidants in EBC

After swimming to high intensity for 3.5 km in an chlorinated indoor swimming pool (79.3 ± 7.0 , % HR_{max}), participants in this study had decreased $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ (see Fig. 2). These results are novel findings since it is our understanding that there are no previous studies evaluating these parameters in swimmers. It may seem paradoxical that active subjects accustomed to the inhalation of Cl_2 and DBP show a decrease in the pro-oxidants measured in EBC, considering the irritative characteristics of these substances on the respiratory system that have been described in both human and animal models (Martin et al. 2003; White and Martin 2010). However, a possible justification may be a compensatory higher development of antioxidant defences (Radak et al. 2008) and/or a lower inflammatory response as a result of chronic exercise (Walsh et al. 2011), which may generate a particular response in the redox state. Nor can it be ruled out that the acute effect of the $[\text{Cl}_2]$ used in the swimming pool does not affect the pulmonary redox state in the long-term.

There are no reports that have evaluated $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ in swimmers, although data are available on NO metabolites in samples of fractional exhaled air (FeNO). Bonsignore et al. (2003) assessed the effects of swimming into an outdoor pool (OP) with low $[\text{Cl}_2]$, and compared it with open sea swimming (hypertonic exposure), on airway cells and FeNO in seven non-asthmatics swimmers which habitually trained in OP. After swimming in OP, FeNO decreased and airway neutrophils did not increase; after sea swimming, FeNO was similar to baseline, associated with a slight increase in airway. Authors suggest that high-humidity environment of swimming in OP may prevent airway cooling, dehydration, and inflammation. In children exposed to high concentrations of Cl_2 in a swimming pool, Bonetto et al. (2006) found increased FeNO in the acute phase, whereas the values after two months were normalized. On the other hand, Carbonnelle et al. (2008) assessed whether an acute swimming session performed in a chlorine-treated pool induces lung inflammation as measured by FeNO in eleven healthy subjects not habitually exposed to chlorine. The exhaled NO increased 34% after exercise post-swimming in a non-chlorinated pool and was unaffected in the chlorinated pool. These results suggest that chlorination might inhibit NO-induced vasodilation observed during swimming in chlorinated pool. It is necessary to remark that these two studies used the measurement of fractional exhaled air, and consequently their results cannot be directly extrapolated to studies as the present where EBC measurement were done. Using EBC method, Pedersen et al. (2009) and Font Ribera et al. (2010) did not find changes in this parameter in elite swimmers. Those studies evaluated only the immediate effect of physical exercise, therefore, it is still unknown what

happens in later stages in subjects with chronic exposure to chlorine and DBP. It has been shown that the activity of the endothelial nitric oxide synthase enzyme (eNOS) increases after physical exercise (Niess et al. 2000), thus suggesting the possibility of increases in NO metabolites at post-stimulus stages. Hence, we included measurement at the 24-h post-exercise stage in our protocol, expecting to find an increase in $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$. However, decreases in both $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ and $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ were observed.

Our experimental protocol does not allow us to examine the unique effect of physical exercise in competitive swimmers. The literature mentions that inhaled Cl_2 and DBP react with the water vapour present in the mucous lining of the airway, producing hydrochloric acid (HCl) and hypochlorous acid (HOCl) (White and Martin 2010); this chemical reaction has been observed under in vitro conditions. Since we also measured these irritants in our experimental model in vivo, a decrease in $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ after swimming could be expected at the early stages (20 min post-exercise), but this did not happen in the present study; however, a decrease in this parameter occurred in the late 24-h post-exercise stage.

We found a decrease in $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ after swimming 3.5 km in an indoor chlorinated pool. Other authors have proposed that HOCl can interact with the H_2O_2 present in the airway, which originates from neutrophils and/or other inflammatory mediators (Evans 2005; White and Martin 2010), and this interaction could explain the decrease in this parameter, as seen in the analysis of trends (see Fig. 2a). According to our knowledge, there are no previous studies that have measured this parameter in swimmers, therefore, our findings should be corroborated with future research. In addition, this comparison could be done in triathletes whose due to their exercise regime they train in both environmental conditions.

Correlations of parameters in EBC

When evaluating the EBC parameters of outdoor running and indoor swimming, a direct correlation was found between the absolute values of $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ as well as in the deltas of both markers (see Fig. 4). These results are similar to those previously reported (Araneda et al. 2012, 2014), which demonstrates the reproducibility

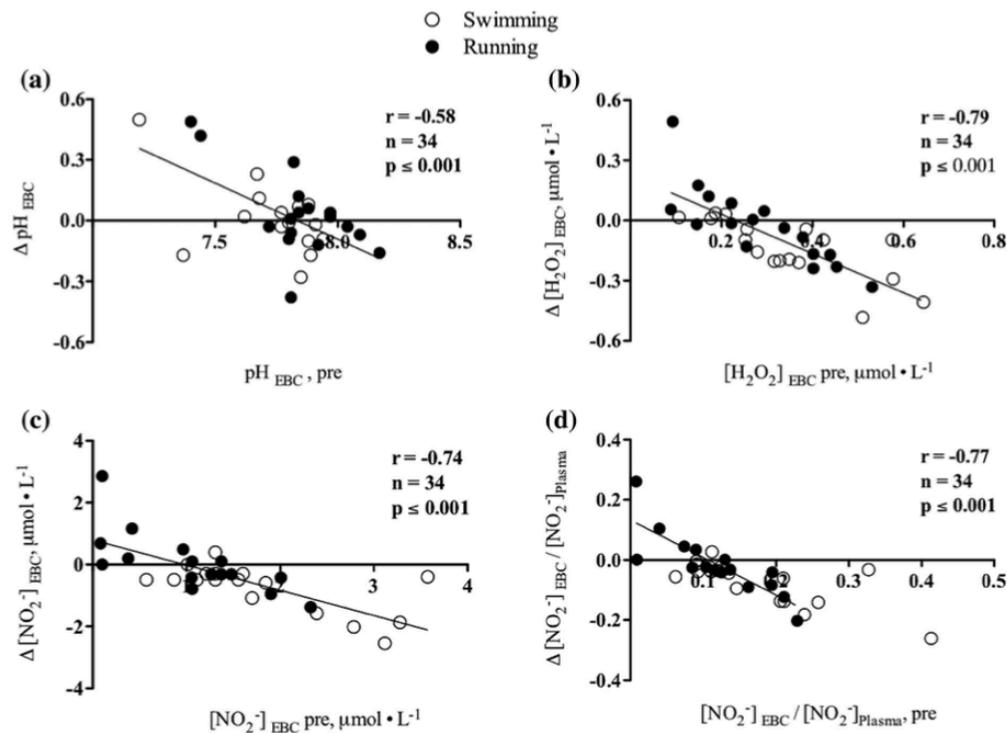


Fig. 4 Correlations between absolute values of pro-oxidants and pH in EBC after a 3.5-km swim (hollow circles) or a 10-km run (filled circles). Pre-exercise values (pre) are on the abscissa, whereas the

changes after 24 h (d) are on the ordinate. The continuous line represents the linear regression equation for both exercise bouts

of our exercise and pulmonary inflammation model. A probable explanation of these findings would be a common origin and/or be a part of common processes.

pH_{EBC}

In this study, pH_{EBC} does not show a clear-cut trend in model 1. Long-distance running events (+21.1 km) have shown a tendency to decrease the pH_{EBC} (Araneda et al. 2012). In this research, when the measurement in the 24 h post-exercise stage was included, we would have expected a decrease in the value; however, no changes were found, in accordance with previous investigations is not accustomed to running healthy subjects (Araneda et al. 2014). On the other hand, a small change in pH_{EBC} after acute exercise can also be attributed to the buffering action of the high blood flow in tight contact with alveolar gas.

Despite the detection of a difference between swimming and running at 20 min post-exercise in model 2, the interpretation of this finding is difficult because there are no differences in the trends analysed by model 1 and because it does not persist at 24 h post-exercise, which would have meant compatibility with inflammatory phenomena of the airway. In addition, for a better understanding of this process, the time between the first and second stages of pH_{EBC} measurement should be reduced because this change is likely transient.

Pulmonary function

The pulmonary function assessment, measured by spirometry, did not detect any significant changes; however, it showed a tendency to increase close to 3% of FEV₁ in the 20-min post-exercise stage, which was similar between both exercises (see Table 2). Hence, we did not perform the mixed model statistical analysis, as for EBC parameters. We consider that the tendency for post-exercise bronchodilation was largely explained, as the swimmers involved were healthy subjects. Contrary to our expectations, we failed to demonstrate a relationship between spirometry values and EBC parameter alterations. It is necessary to note that the spirometry results only 20 min after the end of exercise may eventually be affected, and we cannot disregard the possible influence of dynamic changes in lung biomechanics and volumes during exercise on these measurements.

Limitations

The experimental design of this study does not allow to identify in an isolated way the effects on respiratory redox state of each environmental variable under the exercise protocols were performed. For logistical reasons, it was not possible to randomize the order of the two tests between all

the participants. On the other hand, exhaled breath condensate analysis have a known variability (Horváth et al. 2005), which in addition to the relatively small number of participants, difficult a more clear-cut interpretation of the results.

Furthermore, study participants have a history of chronic exposure to chlorine and DBP, which could have triggered compensatory responses such as induction of antioxidant enzymes, thus eliciting an enhanced ability to cope with redox state alterations at the pulmonary level.

Future research

Further studies are needed to know the impact of physical exercise on the pulmonary redox state in subjects with chronic exposure to chlorine-treated swimming pools by evaluating antioxidant defences, analysing induced sputum samples, and performing new pulmonary function tests to determine the physiological adjustments on the respiratory system elicited by regular indoor swimming. Also, it could be interesting to replicate this experimental design in triathletes under their habitual training routine, because swimming, running, and biking are performed under different environmental conditions. More research is necessary to specifically isolate the covariables present in each particular environment where the exercises are performed, thus permitting to recognize the influence of each one on the production of respiratory pro-oxidants during the increment of pulmonary ventilation in exercise.

Conclusions

In competitive swimmers, the EBC analysis shows that after two different exercises, comparable in duration and intensity and performed at habitual environment conditions, pro-oxidants decrease when swimming in an indoor chlorine-treated swimming pool and increase after outdoor running during a 24-h follow-up, with no changes in lung function.

Acknowledgements This work was supported by the National Fund for Scientific and Technological Development FONDECYT 11130082 (O.A). We acknowledge Mr. Luis Pizarro Zúñiga for technical assistance.

Author contributions O.A: conceived and design research, analysed data, manuscript redaction, final approval. F.C: conceived and design research, analysed data, manuscript redaction, final approval. G.C: analysed data. G.V: analysed data, manuscript redaction, final approval.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Araneda OF, Tuesta M (2012) Lung oxidative damage by hypoxia. *Oxid Med Cell Longev* 2012:856918. <https://doi.org/10.1155/2012/856918>
- Araneda OF, García C, Lagos N et al (2005) Lung oxidative stress as related to exercise and altitude. Lipid peroxidation evidence in exhaled breath condensate: a possible predictor of acute mountain sickness. *Eur J Appl Physiol* 95:383–390. <https://doi.org/10.1007/s00421-005-0047-y>
- Araneda OF, Guevara AJ, Contreras C et al (2012) Exhaled breath condensate analysis after long distance races. *Int J Sports Med* 33:955–961. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1316314>
- Araneda OF, Urbina-Stagno R, Tuesta M et al (2014) Increase of pro-oxidants with no evidence of lipid peroxidation in exhaled breath condensate after a 10-km race in non-athletes. *J Physiol Biochem* 70:107–115. <https://doi.org/10.1007/s13105-013-0285-0>
- Bonetto G, Corradi M, Carraro S et al (2006) Longitudinal monitoring of lung injury in children after acute chlorine exposure in a swimming pool. *Am J Respir Crit Care Med* 174:545–549. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1392OC>
- Bonsignore M, Morici G, Riccobono L et al (2003) Airway cells after swimming outdoors or in the sea in nonasthmatic athletes. *Med Sci Sport Exerc* 35:1146–1152. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000074581.08023.25>
- Carbannelle S, Francaux M, Doyle I et al (2002) Changes in serum pneumoproteins caused by short-term exposures to nitrogen trichloride in indoor chlorinated swimming pools. *Biomarkers* 7:464–478. <https://doi.org/10.1080/13547500210166612>
- Carbannelle S, Bernard A, Doyle IR et al (2008) Fractional exhaled NO and serum pneumoproteins after swimming in a chlorinated pool. *Med Sci Sports Exerc* 40:1472–1476. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181733159>
- Carlisle AJ, Sharp NC (2001) Exercise and outdoor ambient air pollution. *Br J Sports Med* 35:214–222
- Day JR, Rossiter HB, Coats EM et al (2003) The maximally attainable \dot{V}_{O_2} during exercise in humans: the peak vs. maximum issue. *J Appl Physiol* 95:1901–1907. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00024.2003>
- Drobnic F, Freixa A, Casan P et al (1996) Assessment of chlorine exposure in swimmers during training. *Med Sci Sports Exerc* 28:271–274
- Evans RB (2005) Chlorine: state of the art. *Lung* 183:151–167. <https://doi.org/10.1007/s00408-004-2530-3>
- Finaud J, Lac G, Filaire E (2006) Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36:327–358
- Font-Ribera L, Kogevinas M, Zock J-P et al (2010) Short-term changes in respiratory biomarkers after swimming in a chlorinated pool. *Environ Health Perspect* 118:1538–1544. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001961>
- Font-Ribera L, Villanueva CM, Nieuwenhuijsen MJ et al (2011) Swimming pool attendance, asthma, allergies, and lung function in the avon longitudinal study of parents and children Cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 183:582–588. <https://doi.org/10.1164/rccm.201005-0761OC>
- Freed AN, Davis MS (1999) Hyperventilation with dry air increases airway surface fluid osmolality in canine peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1101–1107. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.4.9802072>
- Gay CA, Gebicki JM (2002) Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal Biochem* 304:42–46. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5566>
- Goodman M, Hays S (2008) Asthma and swimming: a meta-analysis. *J Asthma* 45:639–647. <https://doi.org/10.1080/02770900802165980>
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J et al (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and $[^{15}N]$ nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138
- Horváth I, Hunt J, Barnes PJ et al (2005) Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 26:523–548. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00029705>
- Huang W, Wang G, Lu S-E et al (2012) Inflammatory and oxidative stress responses of healthy young adults to changes in air quality during the Beijing Olympics. *Am J Respir Crit Care Med* 186:1150–1159. <https://doi.org/10.1164/rccm.201205-0850OC>
- Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B (1983) Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis* 127:725–734. <https://doi.org/10.1164/arrd.1983.127.6.725>
- Liang Y, Yeligar SM, Brown LAS (2012) Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *Sci World J* 2012:1–7. <https://doi.org/10.1100/2012/217518>
- Lima TM de, Kazama CM, Koczulla AR et al (2013) pH in exhaled breath condensate and nasal lavage as a biomarker of air pollution-related inflammation in street traffic-controllers and office-workers. *Clinics (Sao Paulo)* 68:1488–1494. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(12\)03](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(12)03)
- Marek E, Volke J, Mückenhoff K et al (2013) Exercise in cold air and hydrogen peroxide release in exhaled breath condensate. *Adv Exp Med Biol* 756:169–177. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4549-0_22
- Marr LC, Ely MR (2010) Effect of air pollution on marathon running performance. *Med Sci Sports Exerc* 42:585–591. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181b84a85>
- Martin JG, Campbell HR, Iijima H et al (2003) Chlorine-induced injury to the airways in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 168:568–574. <https://doi.org/10.1164/rccm.200201-021OC>
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V et al (2005) Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 26:319–338. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00034805>
- Morissette MC, Murray N, Turmel J et al (2016) Increased exhaled breath condensate 8-isoprostane after a swimming session in competitive swimmers. *Eur J Sport Sci* 16:569–576. <https://doi.org/10.1080/17461391.2015.1063702>
- Murata K, Fujimoto K, Kitaguchi Y et al (2014) Hydrogen peroxide content and pH of expired breath condensate from patients with asthma and COPD. *COPD* 11:81–87. <https://doi.org/10.3109/15412555.2013.830094>
- Niess AM, Sommer M, Schlotz E et al (2000) Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human leukocytes: responses to running exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32:1220–1225
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP (1994) Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 220:403–409
- Nowak D, Kalucka S, Białasiewicz P, Król M (2001) Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 30:178–186
- Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A et al (2006) Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest* 129:426–430. <https://doi.org/10.1378/chest.129.2.426>
- Pedersen L, Lund TK, Mølgaard E et al (2009) The acute effect of swimming on airway inflammation in adolescent elite swimmers. *J Allergy Clin Immunol* 123:502–504. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.11.039>
- Pierson WE, Covert DS, Koenig JQ et al (1986) Implications of air pollution effects on athletic performance. *Med Sci Sports Exerc* 18:322–327

European Journal of Applied Physiology

- Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88:1243–1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>
- Radak Z, Chung HY, Goto S (2008) Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 44:153–159. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029>
- Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G (2004) Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 84:731–765. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2003>
- Tuesta M, Alvear M, Carbonell T et al (2016) Effect of exercise duration on pro-oxidants and pH in exhaled breath condensate in humans. *J Physiol Biochem* 72:353–360. <https://doi.org/10.1007/s13105-016-0486-4>
- Valenzuela OFA, Encina MPS (2009) Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate. *J Bras Pneumol* 35:69–72
- Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ et al (2011) Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 17:6–63
- White CW, Martin JG (2010) Chlorine gas inhalation: human clinical evidence of toxicity and experience in animal models. *Proc Am Thorac Soc* 7:257–263. <https://doi.org/10.1513/pats.201001-008SM>

4.2 Artículo científico II

Humidity prevents the exercise-induced formation of hydrogen peroxide and nitrite in exhaled breath condensate in recreational cyclist. (2020). Contreras-Briceño, F^{1, 2}; Espinosa-Ramírez, M¹; Viscor, G² & Araneda, OF³. *European Journal of Applied Physiology*, 120 (10): 2339 - 2348

Affiliations:

¹ Laboratory of Exercise Physiology, Department of Health of Science, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

² Physiology Section, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

³ Laboratorio de Fisiología Integrativo de Biomecánica y Fisiología Integrativa (LIBFE), Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile.

PMID: 32772245

DOI: 10.1007/s00421-020-04456-9

European Journal of Applied Physiology
<https://doi.org/10.1007/s00421-020-04456-9>

ORIGINAL ARTICLE



Humidity prevents the exercise-induced formation of hydrogen peroxide and nitrite in exhaled breath condensate in recreational cyclists

Felipe Contreras-Briceño^{1,2} · Maximiliano Espinosa-Ramirez² · Ginés Viscor¹ · Oscar F. Araneda³

Received: 26 January 2020 / Accepted: 31 July 2020
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose The aerobic exercise affects the respiratory redox-state. The influence of different relative humidity (RH) levels on the formation of respiratory reactive chemical species associated with redox-state altered by exercise has been poorly explored. Our aim was to evaluate the effect of two different RH conditions (40% vs. 90%) on the concentration of hydrogen peroxide and nitrite in exhaled breath condensate ($[H_2O_2]_{EBC}$ and $[NO_2^-]_{EBC}$) and spirometry parameters in recreational cyclists.

Methods Sixteen men and women (12/4) (mean age \pm SD: 23.5 ± 2.2 years) completed 60-min of cycling at 166.3 ± 26.9 watts (70% of maximum load of $\dot{V}O_{2\text{-max}}$ test, 49.3 ± 7.6 mL \cdot min $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$) at random 40%-RH and 90%-RH conditions separated by 7 days. The two-way RM-ANOVA test was applied to compare $[H_2O_2]_{EBC}$, $[NO_2^-]_{EBC}$, $[NO_2^-]_{EBC}/[NO_2^-]_{Plasma}$ at rest and 80-min post-exercise (80-post); and spirometry parameters at rest, 20-post and 80-post.

Results The interaction of factors (humidity \times time) was significant in $[H_2O_2]_{EBC}$, $[NO_2^-]_{EBC}$, $[NO_2^-]_{EBC}/[NO_2^-]_{Plasma}$ ($p=0.005$, $p=0.030$, $p=0.043$, respectively). At 40%-RH conditions, the same parameters were higher in 80-post than at rest ($p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.014$, respectively). At the same time, the $[H_2O_2]_{EBC}$ and $[NO_2^-]_{EBC}/[NO_2^-]_{Plasma}$ were higher in 40%-RH than 90%-RH ($p=0.010$, $p<0.001$, respectively). The interaction was significant in FEV₁ ($p=0.013$) and FEF_{25-75%} ($p=0.023$), but not in FEV₁/FVC ($p=0.362$). At 80-post, the changes are kept in 90%-RH ($p<0.001$), diminishing in 40%-RH being similar to rest.

Conclusion In recreational cyclists, 90%-RH prevents the increase of hydrogen peroxide and nitrite in exhaled breath condensate samples observed at 40%-RH and prolonging the bronchodilation until 80-post cycling exercise.

Keywords Exercise · Humidity · Exhaled breath condensate · Oxidative stress · Bronchodilation

Communicated by I. Mark Olfert.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00421-020-04456-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Oscar F. Araneda
 ofaraneda@miuandes.cl

¹ Physiology Section, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

² Laboratory of Exercise Physiology, Department of Health Science, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

³ Laboratory of Integrative Physiology of Biomechanics and Physiology of Effort (LIBFE), Kinesiology School, Faculty of Medicine, Universidad de los Andes, Santiago, Chile

Abbreviations

BSA	Body surface area
EBC	Exhaled breath condensate
FEF _{25-75%}	Forced expiratory flow at 25–75% of maximal
FEV ₁	Forced expiratory volume in first second
FVC	Forced vital capacity
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
NO ₂ ⁻	Nitrite anion
RH	Relative humidity
VE	Lung ventilation
$\dot{V}F_{tot}$	Total lung ventilation (estimated)
$\dot{V}O_2$ – max.	Maximal oxygen consumption

Published online: 09 August 2020

Springer

Introduction

Regular physical exercise favours a better state of health; however, when performed at high intensities or in adverse environmental conditions, alters the oxidation–reduction state of the internal environment, mainly affecting muscle contraction and thus athletic performance (He et al. 2016). The redox state of the respiratory system can also be altered as a result of exercise (Araneda et al. 2016), mainly due to increased lung ventilation ($\dot{V}E$) (Tuesta et al. 2016), dehydration of the airway (Freed and Davis 1999), exposure to hypoxia (Araneda et al. 2005), atmospheric pollution (Carlisle and Sharp 2001), inhalation of respiratory irritants such as chlorine (Araneda et al. 2018), and low environmental temperature (Marek et al. 2013), among other factors. One way to evaluate this phenomenon is through the analysis of respiratory reactive chemical species associated with local redox-state altered by exercise and mediators of inflammation (hydroperoxides, nitrites, malondialdehyde, peroxynitrite, leukotrienes, cytokines, etc.) in exhaled breath condensate (EBC) samples (Mutlu et al. 2001; Horváth et al. 2005; Davis and Montpetit 2018), a methodology that has been used previously and provides noninvasively obtained information about changes in the respiratory system under different conditions. The effect of environmental characteristics on the redox state of lung samples taken in field conditions is a complex scenario in view of the multiple factors that can act as respiratory noxa; for this reason, it is necessary to generate models with environmental variables controlled under laboratory conditions.

Dehydration of the airway has been proposed as one of the main factors involved in the genesis of inflammation and oxidative stress at the respiratory level as a product of physical exercise (Araneda et al. 2016). Under these conditions and as a consequence of increased respiratory flow, the organism is inefficient at saturating with water vapour and tempering inhaled air, which leads to dehydration of the respiratory epithelium and the release of local inflammatory factors, generating bronchoconstriction (Anderson and Kippelen 2005, 2008; Parsons et al. 2013). Previously, it has been shown that performing exercise in moist and temperate environments is beneficial, particularly in patients with asthma, decreasing respiratory work and the energy costs associated with breathing (Goodman and Hays 2008; Anderson and Kippelen 2012).

Our research group has found an increase in these reactive chemical species after competitive runs of 21.1 and 42.2 km (Araneda et al. 2012), in untrained healthy subjects after 10 km (Araneda et al. 2014), and after 90 min of cycling (Tuesta et al. 2016). Recently, when comparing the effect of physical exercise on two different environmental

conditions (swimming indoors vs. running outdoors) in selected swimmers, higher $[H_2O_2]_{EBC}$ and $[NO_2^-]_{EBC}$ were found when comparing running with swimming, with the different levels of environmental humidity influencing these results (Araneda et al. 2018). To our knowledge, there are no previous studies using the EBC methodology that have evaluated the influence of environmental humidity on the production of respiratory reactive chemical species associated with local redox-state altered by exercise in laboratory conditions. The objective of this study was to evaluate, in recreational cyclists, the influence of environmental humidity [40% vs. 90% relative humidity (RH)] on the respiratory production of hydrogen peroxide and nitrite in samples of EBC induced by physical exercise and to relate changes with lung function evaluated by spirometry.

Methods

Participants

Sixteen recreational cyclists with no history of asthma or respiratory infection during the last two weeks prior to the measurements were included. Participants did not consume anti-inflammatory drugs, antioxidants, or any other nutritional supplement (see Table 1). All participants were informed orally and verbally about the study before obtaining a signature acknowledging informed consent. The experimental protocol considered the ethical principles of the Declaration of Helsinki regarding research in humans and was approved by the Ethics Committee of Pontificia Universidad Católica de Chile (Project No. 180921007).

Table 1 Anthropometric characteristics of participants and their ergospirometry variables at maximal intensity of $\dot{V}O_2$ test ($n=16$)

Age (years)	23.5 ± 2.2
Sex (female/male)	4/12
Body weight (kg)	68.1 ± 10.4
Height (cm)	172.1 ± 8.3
BMI ($kg \cdot m^{-2}$)	22.8 ± 1.8
BSA (m^2)	1.80 ± 0.18
$\dot{V}O_2$ ($mL \cdot min^{-1}$)	3443 ± 638
$\dot{V}O_2$ ($mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$)	49.3 ± 0.6
$\dot{V}E$ ($L \cdot min^{-1}$)	137.1 ± 29.9
V_t (mL)	2651 ± 458
RR (bpm)	52 ± 9
Load (W)	240 ± 32

Data are presented as mean ± standard deviation

BMI body mass index, *BSA* body surface area, $\dot{V}O_2$ oxygen consumption, $\dot{V}E$ lung ventilation, V_t tidal volume, *RR* respiratory rate, *Load* watts

Protocol

The evaluations performed were as follows: (i) body anthropometry (weight, height, and body mass index) and (ii) maximum oxygen consumption ($\dot{V}O_{2\text{-max}}$) on a cycle ergometer (ViaSprint 150P, Ergoline GmbH, Traunstein, Germany). The protocol consisted of 1 min of rest, 5 min of warm-up at 40 watts, and a subsequent increase of 20 watts every 2 min to exhaustion despite verbal stimulus (respiratory ratio 1.20 ± 0.05). The cadence was maintained between 70 and 90 rpm. The $\dot{V}O_{2\text{-max}}$ was calculated as the highest value of the final 30 s of the protocol, which is considered a valid index of $\dot{V}O_{2\text{-max}}$ in subjects exercised to the limit of effort tolerance (Day et al. 2003). Respiratory data were analysed *breath-by-breath* using open circuit spirometry and were expressed under standard temperature, pressure and dry (STPD) conditions (MasterScreen CPX, Jaeger™, Germany). During the protocol, lung ventilation ($\dot{V}E$), respiratory rate (RR), tidal volume (V_t) and watts were recorded when reaching $\dot{V}O_{2\text{-max}}$, which correspond to the maximum values reached in these variables (see Table 1). Before each test, the gas analyser and the volume transducer were calibrated according to the manufacturer's instructions. Participants were instructed to avoid intense and strenuous exercise, alcohol consumption within 24 h before measurements and caffeinated beverages and foods within 3 h before the test.

Total lung ventilation ($\dot{V}E_{\text{tot}}$) was estimated from the extrapolation of the $\dot{V}E$ obtained during the $\dot{V}O_{2\text{-max}}$ test, using the measured heart rate and multiplying it by the total exercise time (60 min). In addition, in view of the differences in sex and anthropometric characteristics of the participants, the $\dot{V}E_{\text{tot}}$ was divided by the body surface area (BSA), according to Mosteller RD (Mosteller 1987).

Ambient humidity and temperature: To control the environmental conditions of temperature and RH, an 18 m³ (3 m long, 2 m wide, 3 m high) semi-hermetic chamber made of insulating material (polyester) was constructed on the PVC structure in which the cycloergometer was installed (see Supplementary Online Resource 1). A digital sensor for temperature and RH was installed inside the chamber (temperature range – 10 to 60 °C, precision ± 1 °C, humidity range 10–99%, precision: $\pm 4\%$) (model 445715, Extech Instruments Corporation, Nashua, NH, USA), allowing continuous monitoring and recording. The ambient humidity inside the chamber was regulated by an ultrasonic humidifier (range 20–100% RH) (model A7147, Boneco Healthy Air Company, Widnau, Switzerland). To allow air renewal and maintain a stable ambient temperature, a fan was installed inside the chamber. During physical exercise, all participants were evaluated every 5 min for temperature on the forehead and in the mouth using a dual infrared thermometer (range – 30 to 350 °C; response time 150 ms) (model IRT600,

Extech Instruments Corporation, Nashua, NH, USA). The chamber remained inside the Laboratory of Exercise Physiology [dimensions 400 m³ (10 m long, 10 m wide, 4 m high)]. The environmental conditions in the laboratory remained at 20 °C and 40%-RH during all measurements.

Exercise protocol: Exercise consisted of pedalling at a rate between 70 and 90 rpm on a stationary bike (ViaSprint 150P, Ergoline GmbH, Traunstein, Germany) for 60 min and loads corresponding to 70% of the watts reached in $\dot{V}O_{2\text{-max}}$ test. All participants were monitored for heart rate with a portable monitor. Symptoms of dyspnoea and fatigue of the lower extremities were evaluated using the modified Borg scale (1982). Both heart rate and symptoms of dyspnoea and fatigue were recorded throughout the exercise every 5 min. Participants could only hydrate with up to 1000 mL of water at any time during the protocol and could not consume food, drugs, or stimulants. Once finished, they could be hydrated with isotonic water free of stimulants, antioxidants and/or anti-inflammatory substances while maintaining the usual diet. The order of participation in each condition was randomized (www.randomizer.org). After a wash-out period of no intense physical activity for 7 days, the participants performed the protocol. During the exercise protocol and posterior evaluations, the participants breathed ambient air with an inspired oxygen fraction near to 0.21. The oxygen inspiratory pressure was similar between conditions (40%-RH: 148.27 mm Hg, 90%-RH: 145.92 mm Hg). Figure 1 shows the study design.

The measurements considered were as follows: (i) spirometry [rest, 20- and 80-min post-exercise (20-post and 80-post, respectively)] and (ii) Samples of EBC ($[H_2O_2]_{\text{EBC}}$, $[NO_2^-]_{\text{EBC}}$) and venous blood ($[NO_2^-]_{\text{Plasma}}$) (rest and 80-post). Sampling was performed in the same laboratory under controlled environmental conditions. Participants arrived 30 min before the start of the exercise protocol. Immediately after they arrived at the laboratory, EBC sample collection began, and a medical professional obtained the venous blood sample. Immediately after these measurements, spirometry was performed using a portable spirometer (model ML3500, Carefusion™, San Diego, USA). Established criteria from the European Respiratory Society (ERS) (Miller et al. 2005) were considered when performing the exam. The Knudson et al. (1983) reference values were used to interpret the results.

EBC and venous blood samples: To obtain exhaled air samples, the exhaled breath was cooled and condensed through a previously validated instrument (Araneda et al. 2005). Participants remained at rest, used nasal clamps and washed their mouths with distilled water before starting. The collection lasted 15 min or until obtaining an EBC volume of 1.5 ml. Approximately 4–5 ml of venous blood was drawn from each participant using heparinized blood tubes (BD Vacutainer System, Plymouth, UK) by radial venous

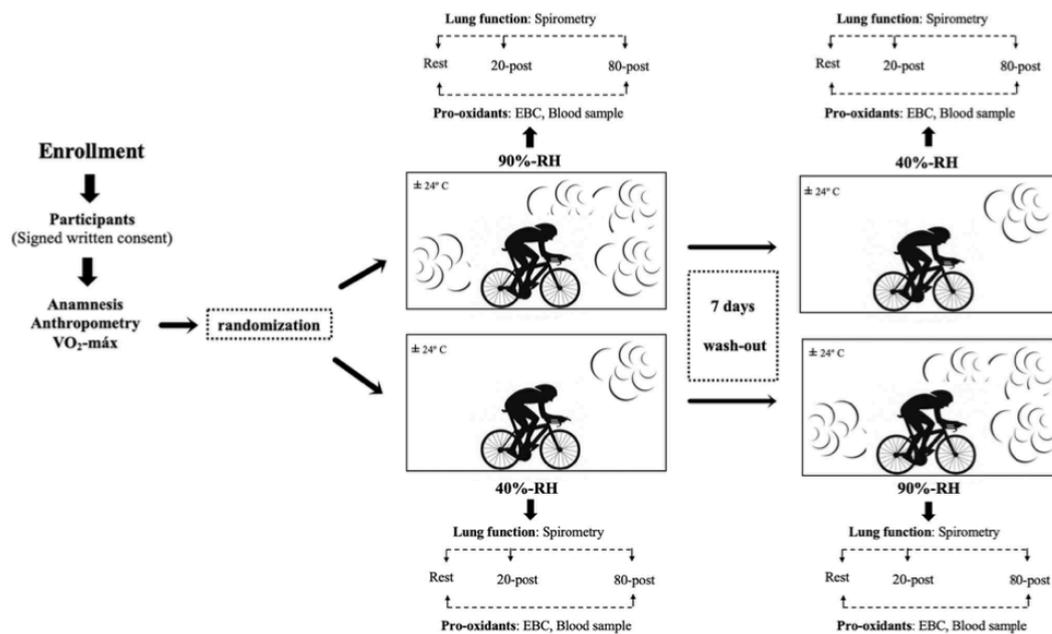


Fig. 1 Study design scheme

puncture. Immediately after obtaining each sample, centrifugation was performed for 10 min at 3000 rpm to separate the plasma from the cellular components. The EBC and plasma samples were duplicated and stored in liquid nitrogen and then at -80°C until further analysis. All samples were obtained between 08:00 and 12:00 h, at least 1 h after consuming a light breakfast.

Hydrogen peroxide in EBC: The $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in EBC was measured using a FOX2 reagent (Nourooz-Zadeh et al. 1994). This reagent contains Fe^{+2} ($250\ \mu\text{M}$), which in an acidic medium (HClO_4 , $110\ \text{mM}$) is oxidized to Fe^{+3} by the presence of H_2O_2 . The amount of H_2O_2 is monitored through the reaction between the ferric ion and the xylenol orange indicator ($250\ \mu\text{M}$). Sorbitol ($100\ \text{mM}$) was added to the original reagent according to Gay and Gebicki (2002); this method has previously been used by our group (Aranceda et al. 2012, 2014, 2018). For measurements, $350\ \mu\text{L}$ of EBC and $150\ \mu\text{L}$ of modified FOX2 were taken, and then the sample was incubated for one hour at room temperature and absorbance was read at $560\ \text{nm}$ on a microplate spectrophotometer (EPOCH™, BioTek Instruments, USA). Three calibration curves were performed for each measurement group using H_2O_2 (Merck) as a standard.

Nitrites in EBC and plasma: The $[\text{NO}_2^-]$ was measured using a spectrophotometric test based on the Griess reaction (Green et al. 1982). Griess reagent ($300\ \mu\text{L}$; 0.1%

naphthylethylenediamine–dihydrochloride, 1% sulphanilamide, $3\% \text{H}_3\text{PO}_4$) was added to $300\ \mu\text{L}$ of EBC or plasma, previously deproteinized with $\text{NaOH}/\text{ZnSO}_4$. The mixture was incubated for 10 min, and absorbance was measured at $550\ \text{nm}$. Three calibration curves were performed for each group's measurements using sodium nitrite (Merck) as a standard.

Statistical analyses

The normality of the data was evaluated using the Shapiro–Wilk test. The variation in the temperature values (air, forehead, and mouth) and RH while performing the exercise protocol were analysed using one-way RM-ANOVA. The comparison of these variables between the different conditions was performed using Student's *t*-test for paired samples. Spirometry and pro-oxidant values measured in EBC and plasma were analysed using two-way RM-ANOVA, reporting differences between conditions when the interaction of the factors (humidity \times time) was significant ($p < 0.05$). Subsequent multiple comparisons were analysed using the Tukey post hoc test. The ratio between the variation in pro-oxidants measured in EBC ($\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$ and $\Delta[\text{NO}_2^-]$) and total estimated lung ventilation with respect to the body surface area ($\dot{V}\text{E}_{\text{tot}}\cdot\text{BSA}^{-1}$) were compared between the different environmental humidity conditions

using Student's *t*-test for paired samples. The Pearson correlation test was used to analyse the association between the $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ with their respective variations and the $\dot{V}\text{E}_{\text{tot}}\cdot\text{BSA}^{-1}$ with $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$. Comparison of symptoms of dyspnoea and fatigue recorded at the end of the protocol was performed using the Mann–Whitney test. The statistical software used was GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

RH and environmental temperature

During the protocol, both the RH and temperature (air, forehead, and mouth) values were stable under both conditions (see Supplementary Online Resource 2). Thus, at 40%-RH, the averages for these variables were $40.6 \pm 1.6\%$, 24.5 ± 1.2 °C, 36.3 ± 0.6 °C, and 35.8 ± 0.4 °C, respectively, while at 90%-RH, the averages were $90.6 \pm 0.6\%$, 24.9 ± 1.0 °C, 36.7 ± 0.8 °C, and 35.7 ± 0.7 °C, respectively. There were no differences between ambient air ($p = 0.349$), forehead ($p = 0.187$), and mouth ($p = 0.606$) temperatures.

Maximum oxygen consumption and physical exercise protocol

The average was 49.3 ± 0.6 mL·min⁻¹·kg⁻¹ with a maximum load of 240 ± 32 watts, while that for the protocol was 166.3 ± 26.9 watts. The heart rate was 165.1 ± 16.6 [$83.9 \pm 7.8\%$ of maximum theoretical HR (220-age)] at 40%-RH and 169.0 ± 15.1 ($86.0 \pm 7.3\%$ of theoretical HR max) at 90%-RH, with no differences ($p = 0.287$). Dyspnoea at the end of the exercise was higher at 90%-RH (median 9, 8–9 (min–max) vs. 7, 7–9 at 40%-RH) ($p = 0.001$). There were no differences in the assessment of lower limb fatigue ($p > 0.100$) (see Supplementary Online Resource 3).

Lung function

The interaction of factors (humidity × time) was different between the two conditions for FEV_1 ($p = 0.013$) and $\text{FEF}_{25-75\%}$ ($p = 0.023$) but not FEV_1/FVC ($p = 0.362$). Thus, the posterior analysis for the time factor showed that at 40%-RH, FEV_1 with respect to rest increased at 20-post (4.14 ± 0.43 vs. 4.33 ± 0.54 , $p < 0.001$) without changes at 80-post (4.14 ± 0.43 vs. 4.21 ± 0.48 ; $p = 0.215$). A similar finding occurred for $\text{FEF}_{25-75\%}$ [4.07 ± 0.67 at rest vs. 4.38 ± 0.84 at 20-post ($p = 0.010$); vs. 4.06 ± 0.72 at 80-post ($p > 0.990$)]. At 90%-RH, FEV_1 showed higher values at 20-post (4.10 ± 0.41 vs. 4.23 ± 0.54 ; $p < 0.001$) and 80-post (4.10 ± 0.41 vs. 4.25 ± 0.49 ; $p < 0.001$).

Similar results occurred for $\text{FEF}_{25-75\%}$ [4.02 ± 0.73 at rest vs. 4.49 ± 0.89 at 20-post ($p < 0.001$); vs. 4.35 ± 0.83 at 80-post ($p = 0.004$)]. The FEV_1/FVC ratio had the same behaviour in both conditions, with an increase at 20-post ($p = 0.004$ to 40%-RH, and $p < 0.001$ to 90%-RH) tending to return to baseline at 80-post.

The comparison between FEV_1 conditions showed no differences at rest and at 80-post. At 20-post, there was a higher value at 40%-RH ($p = 0.037$). For $\text{FEF}_{25-75\%}$, there were no differences at rest and at 20-post or at 80-post ($p = 0.015$). There were no differences in FEV_1/FVC (see Fig. 2).

$[\text{H}_2\text{O}_2]$ and $[\text{NO}_2^-]$ in EBC and plasma

The humidity × time interaction was different in $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.005$), $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.030$), $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ ($p = 0.043$). At 40%-RH, increments were observed for the described parameters [0.195 ± 0.100 to 0.347 ± 0.169 μmol·L⁻¹ in $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ ($p < 0.001$); 1.449 ± 0.470 to 2.058 ± 0.661 μmol·L⁻¹ in $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.001$); and 0.185 ± 0.125 to 0.236 ± 0.069 in $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ ($p = 0.014$)], while at 90%-RH, no differences were observed [0.222 ± 0.110 to 0.243 ± 0.124 μmol·L⁻¹ in $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.874$); 1.543 ± 0.691 to 1.715 ± 0.758 μmol·L⁻¹ in $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.563$); and 0.145 ± 0.072 to 0.150 ± 0.067 in $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ ($p = 0.976$)]. The comparison between conditions showed no differences at rest ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ $p = 0.785$; $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ $p = 0.884$; $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ $p = 0.053$), while at 80-post, there were higher values at 40%-RH for $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.010$) and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ ($p < 0.001$) and a trend for $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ ($p = 0.077$) (see Fig. 3).

The $\dot{V}\text{E}_{\text{tot}}$ was higher at 90%-RH (5051 ± 921 L vs. 4241 ± 929 L in 40%-RH, $p = 0.001$). The means for $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}/\dot{V}\text{E}_{\text{tot}}\cdot\text{BSA}^{-1}$ and $\Delta[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/\dot{V}\text{E}_{\text{tot}}\cdot\text{BSA}^{-1}$ were higher at 40% RH ($p = 0.003$, $p = 0.017$, respectively) (see Fig. 4).

Correlations

$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ was correlated with $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ at 40%-RH ($r = 0.59$, $n = 32$, $p < 0.001$) (Fig. 5a) and 90% RH ($r = 0.35$, $n = 32$, $p = 0.046$) (Fig. 5b). $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ was also correlated with $\Delta[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ at 40%-RH ($r = 0.50$, $n = 16$, $p = 0.044$) (Fig. 5c) but not at 90%-RH (Fig. 5d). Finally, $\dot{V}\text{E}_{\text{tot}}\cdot\text{BSA}^{-1}$ was correlated with $\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ in both conditions (40%-RH: $r = 0.47$, $n = 16$, $p = 0.050$; and in 90%-RH: $r = 0.65$, $n = 16$, $p = 0.005$) (see Supplementary Online Resource 4).

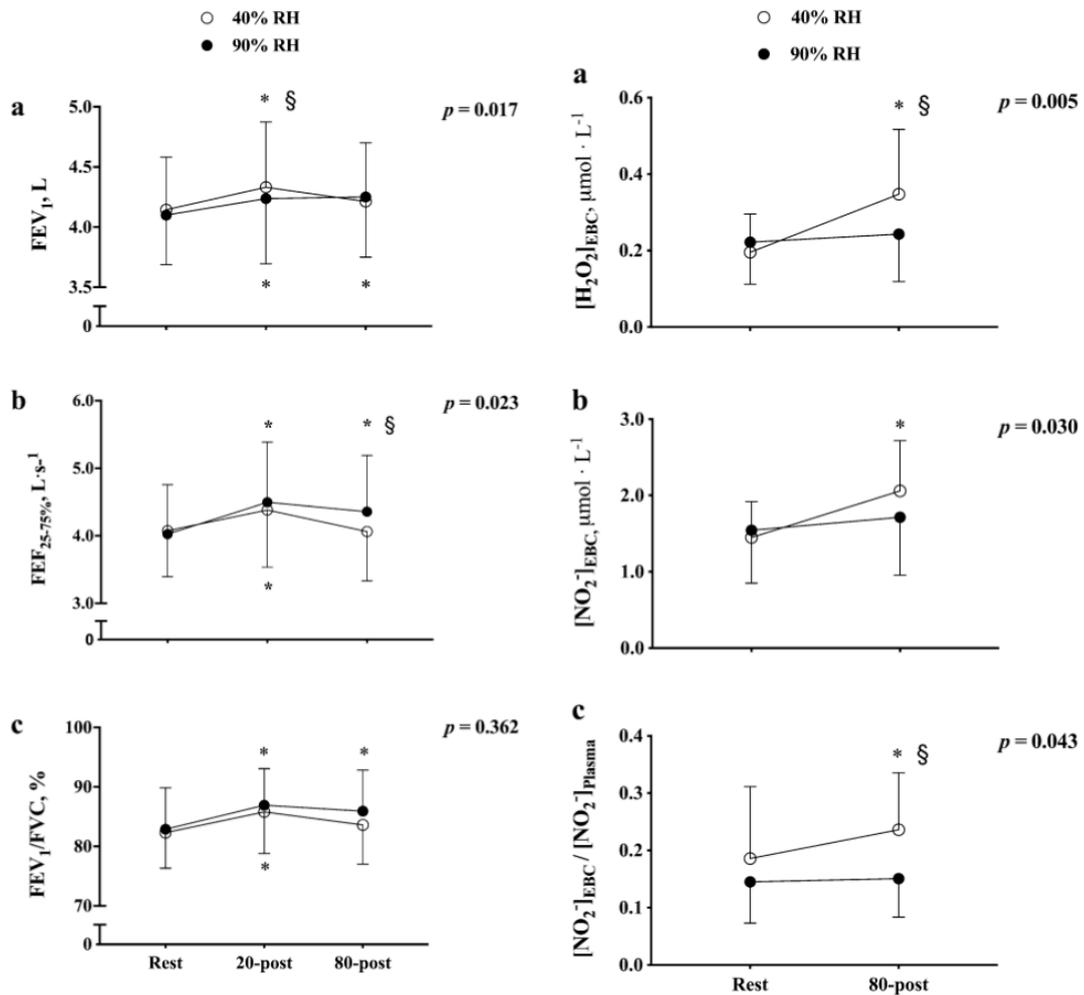


Fig. 2 Lung function. **a** FEV₁ (L) in rest, 20-post, and 80-post-exercise protocol in both conditions. **b** FEF₂₅₋₇₅ (%) in rest, 20-post, and 80-post-exercise protocol in both conditions. **c** FEV₁/FVC (%) in rest, 20-post, and 80-post-exercise protocol in both conditions. **p* < 0.050: comparison intra-condition respect to rest stage. §*p* < 0.050: comparison between-condition at same stage. Absence of a symbol means no significant difference. The interaction between factors (humidity × time) is represented by the *p*-value

Fig. 3 Levels of hydrogen peroxide and nitrite in samples of EBC and plasma. **a** Hydrogen peroxide. **b** Nitrite. **c** Ratio nitrite EBC/nitrite plasma. **p* < 0.05: comparison intra-condition respect to rest. §*p* < 0.05: comparison between-condition at same stage. Absence of a symbol means no significant difference. The interaction between factors (humidity × time) is represented by the *p*-value

Discussion

The main finding of this research was that under laboratory conditions, an hour of intense pedalling by recreational cyclists increased [H₂O₂]_{EBC}, [NO₂⁻]_{EBC}, [NO₂⁻]_{EBC}/[NO₂⁻]_{plasma} at 40%-RH versus 90%-RH, with a general tendency towards bronchodilation, maintained in the condition of higher humidity.

The construction of the semi-hermetic isolated chamber allowed us to study the influence of environmental humidity on the production of these chemical species induced by physical exercise. The chamber maintained the temperature of the ambient air, forehead, and mouth within the normal range and between conditions (see Supplementary Online Resource 2), aspect condition that is very difficult to attain outdoors or in uncontrolled environments.

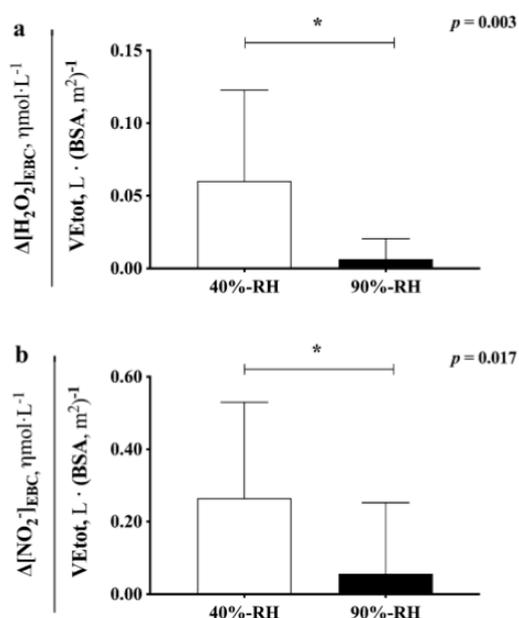


Fig. 4 Comparison between conditions (40% vs. 90%-RH) in relation to ratio of changes of levels of hydrogen peroxide and nitrite in samples of EBC respect of minute ventilation normalized by body surface area. **a** Hydrogen peroxide in EBC. **b** Nitrite in EBC. * $p < 0.050$: comparison between conditions

Changes in lung function

In the two humidity conditions, a physiological bronchodilation response to exercise was found in the 20-post period, which reinforces the adequate health status of the participants. A relevant finding was that this phenomenon was maintained at 80-post only under conditions of higher humidity (FEV_1 , $\text{FEF}_{25-75\%}$, FEV_1/FVC). Among the conditions, differences were found at 80-post for $\text{FEF}_{25-75\%}$, inferring that bronchodilation occurred mainly in the peripheral airway (see Fig. 2). Similar changes have been reported in athletes with and without exercise-induced bronchospasm (Stensrud et al. 2006; Bolger et al. 2011) and in healthy subjects (Kim and Hyong 2015). One possible reason is that high humidity prevents dehydration and hypertonicity of the airway associated with an increase in $\dot{V}\text{E}$ during exercise (Wolkoff 2018). Another aspect that could influence these changes is the biomechanical advantage of the respiratory musculature provided by body position when pedalling (Grappe et al. 1998), which could favour the bronchodilator effect at 20-post but not 80-post, as the participants left that position immediately after the protocol, indicating that the prolonged

bronchodilator effect could be attributed to higher environmental humidity.

We did not find an association between lung function variables with $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$, $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$, and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$; however, we cannot attribute the phenomenon of bronchodilation exclusively to the production of these chemical species. It is likely that other variables related to the symptomatology associated with physical exertion interact in the respiratory response to exercise. In this study, dyspnoea was lower in the 40%-RH group, without changes in muscle fatigue (see Supplementary Online Resource 3). Dyspnoea, because of its multifactorial origin, can be influenced by environmental humidity conditions (Parshall et al. 2012), causing discomfort associated with difficulty breathing or dyspnoea (Sheel et al. 2011).

Changes at $[\text{H}_2\text{O}_2]$ and $[\text{NO}_2^-]$ in EBC and plasma

The increase in $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$, $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$, and $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$ described is analogous in tendency and magnitude to other exercise protocols that our group has previously reported (Araneda et al. 2012, 2014, 2018; Tuesta et al. 2016). H_2O_2 is a chemical mediator that is related to inflammatory processes and/or oxidative stress (Araneda et al. 2016). It is caused by the combination of O^- radicals and H^+ ions, and the reaction is accelerated by superoxide dismutase. In the respiratory system, its genesis falls on phagocytes, type II pneumocytes, and epithelial cells of the airway (Horváth et al. 2005; Araneda et al. 2016). Considering that H_2O_2 is the major oxidant product of enzyme xanthine oxidase (XO) (Kelley et al. 2010), another possible source of $[\text{H}_2\text{O}_2]$ in the respiratory system could be the increment of XO activity which has been seen before in the pulmonary homogenate of rats after the completion of vigorous exercise (Lin et al. 2005; Huang et al. 2008). In this regard, few studies have evaluated changes in $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{EBC}}$ and physical exercise; in healthy subjects, Nowak et al. (2001) found no changes after six minutes of pedalling at 120 watts. Araneda et al. (2005) also found no significant changes in cyclists after three minutes of maximum exercise at 670 m and 2160 m. Recently, Tuesta et al. (2016) reported an increase in this chemical species in laboratory conditions in physically active subjects but only after 90 min of pedalling at 30% of the load reached in the test.

NO_2^- is a metabolite from nitric oxide (NO), which, given its stability, can be measured in EBC (Horváth et al. 2005). During exercise, it is involved in the bronchodilation necessary to increase airflow and, in consequence $\dot{V}\text{E}$; it is also involved in lung vasodilatation and respiratory epithelial vessels. It has also been implicated in pathological processes such as airway inflammation, typical of patients with asthma and COPD (Ricciardolo et al. 2004). Previously, our group reported an increase in amateur runners after 21.1

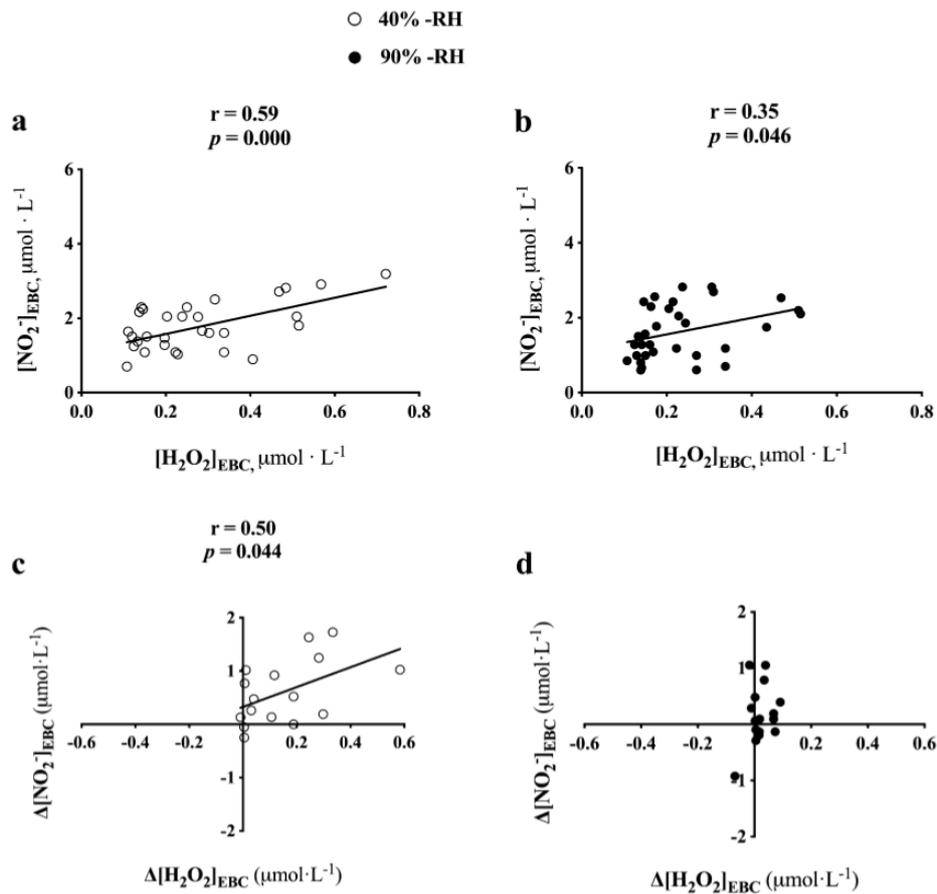


Fig. 5 Correlations. **a** Association between absolute values of concentration of hydrogen peroxide and nitrite in EBC in 40%-RH. **b** Association between absolute values of concentration of hydrogen peroxide and nitrite in EBC in 90%-RH. **c** Association between

changes in concentration of hydrogen peroxide and nitrite in EBC in 40%-RH. **d** Not association between changes in concentration of hydrogen peroxide and nitrite in EBC in 90%-RH

and 42.2 km (Araneda et al. 2012), after 10 km in physically active subjects (Araneda et al. 2014), after 90 min of pedalling in a similar population (Tuesta et al. 2016), and in selected swimmers when running a race outdoors (Araneda et al. 2018).

A possible source of NO_2^- in EBC may be blood nitric oxide (Ricciardolo et al. 2004); thus, our group has investigated the relationship between the two parameters ($[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}/[\text{NO}_2^-]_{\text{Plasma}}$) to establish the local origin of NO_2^- detected in exhaled air. We have previously observed increases in this ratio after a 10 km run (Tuesta et al. 2016; Araneda et al. 2018). In agreement with the above, our current data show a similar trend in the protocol measured under conditions of lower humidity (see Fig. 3c).

Another alternative for increasing $[\text{NO}_2^-]_{\text{EBC}}$ could be in relation to eNOS activity in the pulmonary endothelial cell, which could be upregulated in response to exercise and then facilitate the diffusion of NO to the airspace and the oxidation process (Iring et al. 2019).

Regarding the mechanisms of the changes observed in these respiratory reactive chemical species measured, one of the potential sources of its origin, if not the main source, corresponds to the greater air flow characteristics during exercise. This would act by decreasing the temperature, generating desiccation and bringing irritating/contaminating substances to the epithelial lining (Araneda et al. 2016). Previously, our group found that an increased $\dot{V}\text{E}$ during exercise is directly associated with absolute

changes in $[H_2O_2]_{EBC}$ (Tuesta et al. 2016; Araneda et al. 2018).

The type of exercise (swimming, running, pedalling, etc.), environmental conditions (altitude, temperature, humidity) and anthropometric characteristics determine the magnitude of $\dot{V}E$ in exercise. Thus, in the current report, we found that a similar protocol in time and load generated increased dyspnoea (see Supplementary Online Resource 3) and observed $\dot{V}E$ at higher environmental humidity. To study the effect of environmental and anthropometric differences, we analysed the correlations between $\dot{V}E$ -BSA and the absolute changes of $[H_2O_2]_{EBC}$, $[NO_2^-]_{EBC}$, or $[NO_2^-]_{EBC}/[NO_2^-]_{Plasma}$, finding direct associations for $[H_2O_2]_{EBC}$ in the two environmental conditions (see Supplementary Online Resource 4). In addition, the relationship between these factors showed lower values under conditions of higher humidity, which supports the idea that when water vapour is higher in the airway, the pro-oxidative effect of exercise due to increased $\dot{V}E$ is lower. To our knowledge, there are no previous reports where the humidity had a crucial role in the production of respiratory chemical species induced-by-exercise related to altered redox-state. One study in trained divers found an increase of 8-isoprostane and 8-OH-2-deoxyguanosine after 15 min of hyperbaric hyperoxic exposure using a closed-circuit rebreather in warm water, with no changes in spirometry parameters (Bosco et al. 2018). In this study, the interaction between high relative humidity (100%), water temperature (31–32 °C), and oxygen levels of the closed-circuit rebreather were responsible for increasing in chemical species associated to lipid and DNA damages. Unfortunately, the influence of exercise was not assessed, and urine samples were analysed, so the results obtained could be associated with systemic changes and not exclusive to the respiratory system, thus making difficult the comparison with our results.

Limitations

A greater number of women would have allowed a differential analysis by sex by virtue of the differences in breathing patterns used to increase the physical effort $\dot{V}E$. In this study, there was an association between $\dot{V}E_{Tot}$ and changes in $[H_2O_2]_{EBC}$, and although $\dot{V}E$ was not directly measured, a similar association has been previously reported by our group with direct measurements of $\dot{V}E$ (Tuesta et al. 2016), which allows us to confirm some reproducibility in the phenomenon. Finally, we also did not evaluate the degree of moisture in the respiratory epithelium or the factors that could have affected its hydration (changes in body fluids and air flow to the different lung regions), thus helping to sustain the dehydrating effect of the increase in $\dot{V}E$ as a mechanistic

source of the production of the respiratory reactive chemical species measured in this study.

Conclusions

In recreational cyclists, high environmental humidity prevents the respiratory production of hydrogen peroxide and nitrite induced by intense physical exercise, preserving bronchodilation even 80 min after the end of effort.

Acknowledgements We acknowledge Mr. Luis Pizarro Zúñiga for technical assistance.

Author contributions FCB: protocol design, data analysis, manuscript redaction, final approval. MER: measurement, data base management. GV: data analysis, manuscript redaction, final approval. OA: concept and design the study, data analysis, manuscript redaction, final approval.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Anderson S, Kippelen P (2005) Exercise-induced bronchoconstriction: pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep* 05:116–122. <https://doi.org/10.1007/s11882-005-0084-y>
- Anderson S, Kippelen P (2008) Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *J Allergy Clin Immunol* 122:225–235. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.05.001>
- Anderson S, Kippelen P (2012) Assessment and prevention of exercise-induced bronchoconstriction. *Br J Sports Med* 46:391–396. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090810>
- Araneda O, García C, Lagos N et al (2005) Lung oxidative stress as related to exercise and altitude. Lipid peroxidation evidence in exhaled breath condensate: a possible predictor of acute mountain sickness. *Eur J Appl Physiol* 95:383–390. <https://doi.org/10.1007/s00421-005-0047-y>
- Araneda O, Guevara A, Contreras C et al (2012) Exhaled breath condensate analysis after long distance races. *Int J Sports Med* 33:955–961. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1316314>
- Araneda O, Urbina-Stagno R, Tuesta M et al (2014) Increase of pro-oxidants with no evidence of lipid peroxidation in exhaled breath condensate after a 10-km race in non-athletes. *J Physiol Biochem* 70:107–115. <https://doi.org/10.1007/s13105-013-0285-0>
- Araneda O, Carbonell T, Tuesta M (2016) Update on the mechanisms of pulmonary inflammation and oxidative imbalance induced by exercise. *Oxid Med Cell Longev*
- Araneda O, Contreras-Briceño F, Cavada G, Viscor G (2018) Swimming versus running: effects on exhaled breath condensate pro-oxidants and pH. *Eur J Appl Physiol* 118:2319–2329. <https://doi.org/10.1007/s00421-018-3958-0>
- Bolger C, Tufvesson E, Anderson S et al (2011) Effect of inspired air conditions on exercise-induced bronchoconstriction and urinary CC16 levels in athletes. *J Appl Physiol* 111:1059–1065. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00113.2011>

- Borg G (1982) Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc* 14:377–381
- Bosco G, Rizzato A, Quaratesan S et al (2018) Spirometry and oxidative stress after rebreather diving in warm water. *Undersea Hyperb Med* 45:191–198
- Carlisle A, Sharp N (2001) Exercise and outdoor ambient air pollution. *Br J Sports Med* 35:214–222. <https://doi.org/10.1136/bjism.35.4.214>
- Davis M, Montpetit A (2018) Exhaled breath condensate: an update. *Immunol Allergy Clin North Am* 38:667–678. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2018.06.002>
- Day J, Rossiter H, Coats E et al (2003) The maximally attainable VO_2 during exercise in humans: The peak vs. maximum issue. *J Appl Physiol* 95:1901–1907. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00024.2003>
- Freed A, Davis M (1999) Hyperventilation with dry air increases airway surface fluid osmolality in canine peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1101–1107. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.4.9802072>
- Gay C, Gebicki J (2002) Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay. *Anal Biochem* 304:42–46. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5566>
- Goodman M, Hays S (2008) Asthma and swimming: a meta-analysis. *J Asthma* 45:639–647. <https://doi.org/10.1080/02770900802165980>
- Grappe F, Candau R, Busso T, Rouillon J (1998) Effect of cycling position on ventilatory and metabolic variables. *Int J Sports Med* 19:336–341. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971927>
- Green L, Wagner D, Glogowski J et al (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- He F, Li J, Liu Z et al (2016) Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. *Front Physiol* 07:486. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00486>
- Horváth I, Hunt J, Barnes P et al (2005) Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 26:523–548. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00029705>
- Huang C, Tsai S, Lin W (2008) Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. *Exp Gerontol* 43:571–577. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.03.002>
- Iring A, Jin Y, Albarrán-Juárez J et al (2019) Shear stress-induced endothelial adrenomedullin signaling regulates vascular tone and blood pressure. *J Clin Invest* 129:2775–2791. <https://doi.org/10.1172/JCI123825>
- Kelley E, Khoo N, Hundley N et al (2010) Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med* 48:493–498. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.012>
- Kim J, Hyong I (2015) Analysis of changes in pulmonary functions at rest following humidity changes. *J Phys Ther Sci* 27:1063–1065. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.1063>
- Knudson R, Lebowitz M, Holberg C, Burrows B (1983) Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis* 127:725–734. <https://doi.org/10.1164/arrd.1983.127.6.725>
- Lin W, Yang S, Chen K et al (2005) Protective effects of L-arginine on pulmonary oxidative stress and antioxidant defenses during exhaustive exercise in rats. *Acta Pharmacol Sin* 26:992–999. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00155.x>
- Marek E, Volke J, Mückenhoff K et al (2013) Exercise in cold air and hydrogen peroxide release in exhaled breath condensate. *Adv Exp Med Biol* 756:169–177. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4549-0_22
- Miller M, Hankinson J, Brusasco V et al (2005) Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 26:319–338. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00034805>
- Mosteller R (1987) Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 317:1098. <https://doi.org/10.1056/NEJM198710223171717>
- Mutlu G, Garey K, Robbins R et al (2001) Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 164:731–737. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.5.2101032>
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff S (1994) Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 220:403–409. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1357>
- Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P, Król M (2001) Exhalation of H_2O_2 and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 30:178–186. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00457-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00457-3)
- Parshall M, Schwartzstein R, Adams L et al (2012) An official American Thoracic Society statement: update on the mechanisms, assessment, and management of dyspnea. *Am J Respir Crit Care Med* 185:435–452. <https://doi.org/10.1164/rccm.201111-2042ST>
- Parsons J, Hallstrand T, Mastrorade J et al (2013) An official American Thoracic Society clinical practice guideline: exercise-induced bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 187:1016–1027. <https://doi.org/10.1164/rccm.201303-0437ST>
- Ricciardolo F, Sterk P, Gaston B, Folkerts G (2004) Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 84:731–765. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2003>
- Sheel A, Foster G, Romer L (2011) Exercise and its impact on dyspnea. *Curr Opin Pharmacol* 11:195–203. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.04.004>
- Stensrud T, Berntsen S, Carlsen K (2006) Humidity influences exercise capacity in subjects with exercise-induced bronchoconstriction (EIB). *Respir Med* 100:1633–1641. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2005.12.001>
- Tuesta M, Alvear M, Carbonell T et al (2016) Effect of exercise duration on pro-oxidants and pH in exhaled breath condensate in humans. *J Physiol Biochem* 72:353–360. <https://doi.org/10.1007/s13105-016-0486-4>
- Wolkoff P (2018) Indoor air humidity, air quality, and health: an overview. *Int J Hyg Environ Health* 221:376–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.01.015>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.3 Artículo científico III

Reliability of NIRS portable device for measuring intercostal muscles oxygenation during exercise. (2019). Contreras-Briceño, F^{1,2}; Espinosa-Ramirez, M¹; Hevia, G¹; Llambias, D¹; Carrasco, M¹; Cerda, F¹; López-Fuenzalida, A¹; García, P¹; Gabrielli, L¹ & Viscor, G². *Journal of Sports Sciences*, 37 (23): 2653 - 2659.

Affiliations:

¹ Laboratory of Exercise Physiology, Department of Health of Science, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

² Physiology Section, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

PMID: 31419921

DOI: 10.1080/02640414.2019.1653422

Reliability of NIRS portable device for measuring intercostal muscles oxygenation during exercise

Felipe Contreras-Briceño ^{a,b}, Maximiliano Espinosa-Ramírez ^a, Gonzalo Hevia ^a, Diego Llambias ^a, Miguel Carrasco ^a, Francisco Cerda ^a, Antonio López-Fuenzalida ^a, Patricio García ^a, Luigi Gabrielli ^c and Ginés Viscor ^b

^aLaboratory of Exercise Physiology, Department of Health Science, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile;
^bPhysiology Section, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain;
^cAdvanced Center for Chronic Diseases (ACCDiS), School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

ABSTRACT

This study assessed the intra-individual reliability of oxygen saturation in intercostal muscles (SmO_2 -*m.intercostales*) during an incremental maximal treadmill exercise by using portable NIRS devices in a test-retest study. Fifteen marathon runners (age, 24.9 ± 2.0 years; body mass index, 21.6 ± 2.3 kg·m⁻²; $\dot{V}O_2$ -peak, 63.7 ± 5.9 mL·kg⁻¹·min⁻¹) were tested on two separate days, with a 7-day interval between the two measurements. Oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) was assessed using the *breath-by-breath* method during the $\dot{V}O_2$ -test, while SmO_2 was determined using a portable commercial device, based in the near-infrared spectroscopy (NIRS) principle. The minute ventilation (VE), respiratory rate (RR), and tidal volume (Vt) were also monitored during the cardiopulmonary exercise test. For the SmO_2 -*m.intercostales*, the intraclass correlation coefficient (ICC) at rest, first (VT1) and second ventilatory (VT2) thresholds, and maximal stages were 0.90, 0.84, 0.92, and 0.93, respectively; the confidence intervals ranged from -10.8% – $+9.5\%$ to -15.3% – $+12.5\%$. The reliability was *good* at low intensity (rest and VT1) and *excellent* at high intensity (VT2 and max). The Spearman correlation test revealed ($p \leq 0.001$) an inverse association of SmO_2 -*m.intercostales* with $\dot{V}O_2$ ($\rho = -0.64$), VE ($\rho = -0.73$), RR ($\rho = -0.70$), and Vt ($\rho = -0.63$). The relationship with the ventilatory variables showed that increased breathing effort during exercise could be registered adequately using a NIRS portable device.

ARTICLE HISTORY

Accepted 24 July 2019

KEYWORDS

Muscle oxygenation; exercise; respiration; near-infrared spectroscopy

Introduction

At rest, the oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) associated with respiration in healthy adults is estimated to be 2% of the total oxygen requirement (Mortola, 2019), an aspect attributed essentially to the contraction of the respiratory muscles (work of breathing [WOB]). In physical exercise, owing to increased minute ventilation (VE), the WOB increased to $8.8\% \pm 3.3\%$ of $\dot{V}O_2$ -peak in trained subjects (Vella, Marks, & Robergs, 2006), 10–15% in physically inactive subjects (Aaron, Johnson, Seow, & Dempsey, 1992), and 30–45% in patients with chronic respiratory diseases (e.g. COPD and pulmonary fibrosis) (Bell, Saunders, Elborn, & Shale, 1996; Levison & Cherniack, 1968). Increased WOB product of physical exercise entails greater blood flow and O₂ delivery to the respiratory musculature; thus shorting nutrient and metabolites delivery to the locomotor muscles, thereby causing fatigue and intolerance to effort and early arrest of physical exercise (Dempsey, Romer, Rodman, Miller, & Smith, 2006; Dominelli et al., 2017).

To record the O₂ levels in muscle tissue, various portable near-infrared spectroscopy (NIRS) devices have been used in superficial muscle groups to attain the optical changes at different wavelengths for the assessment of muscular oxygen saturation (SmO_2) in a simple and non-invasive way (Boushel et al., 2001; Scheeren, Schober, & Schwarte, 2012). In sport sciences, SmO_2 has mainly

been evaluated in locomotor musculature (e.g. *musculi vastus lateralis* and *m. tibialis anterior*) (Perrey & Ferrari, 2018), with adequate values for validity (Mancini et al., 1994) and reliability (Crum, O'Connor, Van Loo, Valckx, & Stannard, 2017; Thiel, Vogt, Himmelreich, Hübscher, & Banzer, 2011), making it possible to expand its range of applicability to include prescribing the optimal intensity of work in rehabilitation and physical training programmes (Iannetta, Qahtani, Mattioni, & Murias, 2017; Perrey & Ferrari, 2018). Although the SmO_2 of locomotor muscles is an important variable to consider to improve the physical performance of the athlete, its value can be conditioned to the energy demand of the respiratory muscles associated with WOB during physical effort (Romer, Lovering, Haverkamp, Pegelow, & Dempsey, 2006), an aspect that varies among different disciplines and sports (Power, Handrigan, & Basset, 2012), and by the ventilatory pattern characteristic of the athlete (Legrand et al., 2007; Naranjo, Centeno, Galiano, & Beaus, 2005). These aspects motivate the interest in assessing SmO_2 in respiratory muscles during physical exercise. In this regard, studies have evaluated SmO_2 in inspiratory muscles under different conditions of increased WOB in both athletes and patients (Kowalchuk, Rossiter, Ward, & Whipp, 2002; Tanaka et al., 2018; Vogiatzis et al., 2010, 2009). Although the conclusions are similar regarding the existence of deoxygenation as the intensity of exercise increases, to our knowledge, no studies

CONTACT Felipe Contreras-Briceño  fcontrerasb@uc.cl  Laboratory of Exercise Physiology, Department of Health Science, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Avenida Vicuña Mackenna 4860, Santiago, Chile

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

have reported the degree of agreement of values. This is a relevant aspect given the existence of heterogeneity in the acquired ventilation pattern during intra- and inter-subject exercise (Nicolò, Girardi, Bazzucchi, Felici, & Sacchetti, 2018). Thus, the main objective of this study was to determine the reliability of SmO_2 in intercostal muscles (SmO_2 -*m. intercostales*) during a maximal incremental exercise in long-distance runners using a test-retest design. As a secondary objective, we examined the associations of SmO_2 -*m. intercostales* with $\dot{V}O_2$, VE, RR, and Vt to determine the extent of WOB as a performance limiting factor due to its increase with the different ventilatory patterns developed during physical exercise.

Material and methods

Participants

Fifteen male marathon runners (age, 24.9 ± 2.0 years; height, 173.7 ± 6.2 cm; weight, 65.2 ± 6.2 kg; body mass index [BMI], 21.6 ± 2.3 $kg \cdot m^{-2}$) without a history of systemic problems, such as respiratory, cardiovascular, metabolic, musculoskeletal, or neoplastic diseases, or any infectious or inflammatory process, for at least 2 weeks prior to the measurements were recruited for the study. The participants did not consume drugs, antioxidants, or any nutritional support. All were informed orally and in writing about the study before signing the informed consent form. This study was approved by the ethics committee of the Pontificia Universidad Católica de Chillí, with project n° 180305007, in observance of the Declaration of Helsinki on experimentation in humans beings and in accordance with the ethical standards suggested by Harris et al. (Harriss, Macsween, & Atkinson, 2017).

The participants did not vary in terms of the level of physical training, and nutritional or sleeping habit during the period between the two measurements. For the participants to exert the same level of physical effort in the measurements, they were blinded to the results until after the second measurement was completed.

Test procedure

To establish the test-retest replicability of the variables SmO_2 , $\dot{V}O_2$, VE, RR, and Vt, the evaluation procedures described below were repeated by each subject with seven days of separation between the two tests, under the same environmental laboratory conditions (ambient temperature, $22^\circ C \pm 2^\circ C$; relative humidity, $40\% \pm 2\%$) and hourly range (9:00 a.m. to 2:00 p.m.).

All the participants were instructed not to perform physical activity for 24 hr prior to the day of measurement and to avoid intakes of alcohol, caffeine, or other stimulants and food for at least 3 h before.

On the two days of measurement, peak oxygen consumption ($\dot{V}O_2$ -peak) was measured on a treadmill ergometer (HP Cosmos, Traunstein, Germany) in an incremental exercise until voluntary exhaustion, despite oral breathing (respiratory quotient, 1.20 ± 0.05).

The exercise protocol consisted of a 3-min rest, 5-min warm-up ($8 \text{ km} \cdot \text{hr}^{-1}$), and subsequent increase of $2 \text{ km} \cdot \text{hr}^{-1}$ every 150 s, until all criteria for stopping the test were met

(Taylor, Buskirk, & Henschel, 1955). Heart rate, pulse saturation, and ventilatory variables (VE, RR, and Vt, respectively) were continually recorded. The subjective sensation of physical effort was evaluated seconds before the end of each phase (Borg, 1982).

Measurement of SmO_2

During incremental tests, muscle oxygen saturation (SmO_2) was non-invasively evaluated using the Moxy (Fortiori Design LLC, Minnesota, USA), which emits light waves close to the infrared range (NIRS, 630–850 nm) from diodes to the surrounding tissue. It records the amount of light that returns to two detectors positioned 12.5 and 25 mm from the source, thus locally recording the blood flow and oxygenation through the interpretation of the total haemoglobin level in muscle capillaries (THb). The light penetration depth is half the distance between the emitting source and the detector (Austin et al., 2005).

The SmO_2 levels of respiratory musculature correspond to the recorded values of muscular oxygenation of *m. intercostales*. Thus, a Moxy device was located in the seventh intercostal space of the anterior axillary line of the right hemi-thorax, in accordance with previous research protocols (Vogiatzis et al., 2010, 2009) (Figure 1(a)). To report the SmO_2 reliability values of locomotor muscles (*m. vastus lateralis*) during treadmill exercise and to supplement scientific information regarding published data obtained using cycle ergometry, a second Moxy device was placed 5 cm lateral to the midpoint of the imaginary line between the upper edge of the patella and the greater trochanter of the femur (Figure 1(b)), a position similar to that used in previous studies which used cycle ergometer exercise (Crum et al., 2017; Thiel et al., 2011; Vogiatzis et al., 2011) and we consider as representative of oxygenation in locomotor muscles.

The devices were attached to the skin, using the material suggested by the manufacturer, in addition to extra fixation with a cohesive band on the surroundings of the measurement zone, avoiding excessive compression, which could alter the SmO_2 record.

Ergospirometry

Ventilatory data ($\dot{V}O_2$, VE, RR, and Vt) were obtained using the *breath-by-breath* method during the incremental exercise tests for the individual evaluation of maximum oxygen consumption capacity and expressed under standard temperature and pressure dry conditions (MasterScreen CPX Jaeger, Germany). Before each test, the gas analyser and volume transducer were calibrated according to the manufacturer's instructions.

Data analysis

For the adequate collection of information, the start of registration of the variables obtained using the ergospirometer and the SmO_2 device were synchronised. Thus, each subject in standing position had an initial record of 90 s, followed by 180 s corresponding to the rest phase. For the data analysis, the ventilatory threshold phases 1 (VT1) and 2 (VT2) and $\dot{V}O_2$ -

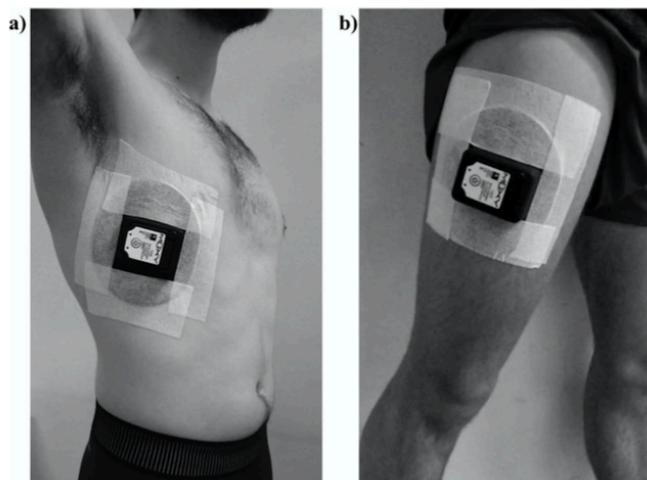


Figure 1. Positions of the muscle oximetry NIRS devices: (a) thorax (*m. intercostales*) and (b) locomotor (*m. vastus lateralis*).

peak were selected. The thresholds were determined by two experienced and blinded evaluators. VT1 was the initial departure from VE linearity, the beginning of a systematic increase in the ventilatory equivalent of O₂ ($VE \cdot \dot{V}O_2^{-1}$) and the pressure value of O₂ (Pet-O₂). VT2 was the secondary increase in VE, $VE \cdot \dot{V}O_2^{-1}$, a marked increase in the ventilatory equivalent of CO₂ ($VE \cdot \dot{V}CO_2^{-1}$) and a decrease in the pressure value at the end of CO₂ expiration (Pet-CO₂) during exercise, above VT1. In case of a discrepancy between the evaluators, the opinion of an experienced third blinded evaluator was possible, accepting as the definitive criterion that point at which at least 2 evaluators agreed. In this study, none of the cases showed differences between the evaluators.

The maximum value reached in the test was identified as the $\dot{V}O_2$ -peak phase, considered as the highest value obtained in the last 30 s during the incremental test of maximum effort. For the statistical analysis, the values of the variables of interest corresponded to the average of the last 30 s of the rest phases, namely VT1, VT2, and $\dot{V}O_2$ -peak.

Statistical analysis

To determine replicability, the intraclass correlation coefficient (ICC) and limits of agreement were used in accordance with the analysis proposed by Bland and Altman (Bland & Altman, 1986; Giavarina, 2015; Koo & Li, 2016). ICC is considered *low* at values <0.5, *moderate* between 0.5 and 0.75, *good* between 0.76 and 0.9, and *excellent* at values >0.9 (Koo & Li, 2016).

To assess whether the results differed between measurements 1 (test) and 2 (retest), confidence intervals (95% CI) were calculated to determine the averages of the means of the differences of all the variables evaluated. The interpretation considered no differences when the null value was within the confidence interval. The significance level for all the variables was $p < 0.05$. The statistical software used was STATA version 14.0 (StatsCorp, Texas, USA).

Using the GraphPad Prism 7 software, the Spearman rank correlation test was used to analyse the relationship among the maximum changes of the ventilatory variables VE, RR, and Vt and the differences in SmO₂-*m. intercostales*. The value used to objectify a relationship between the differences in the variables was $p < 0.05$.

Results

Reliability

The values (mean \pm standard deviation) of SmO₂ in test and retest (*m. intercostales* and *m. vastus lateralis*), and $\dot{V}O_2$, VE, RR, and Vt in the phases analysed (rest, VT1, VT2, and maximal) are shown in Table 1. The ICC ranged from 0.84 to 0.93 for SmO₂-*m. intercostales*, from 0.95 to 0.97 for SmO₂-*m. vastus lateralis*, from 0.97 to 0.99 for $\dot{V}O_2$, from 0.84 to 0.94 for VE, from 0.70 to 0.94 for RR, and from 0.83 to 0.92 for Vt, with VT1 being the phase with lower ICC and greater variability. The limits of agreement in SmO₂-*m. intercostales* VE and RR are wider as the intensity of exercise increased. No relevant findings were observed for the other variables (Table 1).

The average of the relative differences between the two measurements (test and retest) is shown in Table 2. No significant differences were found between the measurements, with the null value within the proposed confidence interval (95%).

Correlations

The associations of SmO₂-*m. intercostales* and SmO₂-*m. vastus lateralis* with $\dot{V}O_2$ -peak, VE, RR, and Vt were analysed using the Spearman correlation coefficient, considering the average between the test and retest measurements. Thus, SmO₂-*m. intercostales* positively correlated with SmO₂-*m. vastus lateralis* ($\rho = 0.73$; $p < 0.001$) but negatively correlated with $\dot{V}O_2$ -peak

4 F. CONTRERAS-BRICEÑO ET AL.

Table 1. Test-retest values (mean \pm standard deviation), intraclass coefficient correlation (ICC), and limits of agreement for physiological variables during incremental treadmill exercise.

		Test	Retest	ICC		Limits of agreement
				R	(95% CI)	
SmO_2 - <i>m.intercostales</i> , (%)	rest	69.3 \pm 11.5	70.4 \pm 11.1	0.90	(0.73 – 0.97)	-10.8; +9.5
	VT1	63.2 \pm 10.4	62.0 \pm 11.3	0.84	(0.59 – 0.94)	-11.3; +13.5
	VT2	51.0 \pm 17.4	49.6 \pm 16.4	0.92	(0.80 – 0.98)	-11.3; +14.1
	max	28.8 \pm 17.0	30.2 \pm 18.9	0.93	(0.79 – 0.97)	-15.3; +12.5
SmO_2 - <i>m.vastus lateralis</i> , (%)	rest	64.0 \pm 10.5	63.7 \pm 10.7	0.95	(0.85– 0.98)	-6.2; +7.0
	VT1	49.5 \pm 9.5	49.0 \pm 10.6	0.97	(0.90– 0.98)	-4.5; +5.6
	VT2	35.6 \pm 10.5	35.5 \pm 10.8	0.95	(0.86 – 0.98)	-6.5; +6.8
	max	19.2 \pm 7.9	19.2 \pm 7.5	0.95	(0.86 – 0.98)	-4.8; +4.9
VO_2 , (mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	rest	6.5 \pm 0.7	6.6 \pm 0.6	0.97	(0.92 – 0.98)	-0.3; +0.3
	VT1	33.0 \pm 2.9	32.8 \pm 2.9	0.97	(0.94 – 0.99)	-0.9; +1.3
	VT2	53.9 \pm 4.2	54.2 \pm 4.2	0.99	(0.98 – 0.99)	-1.1; +0.7
	max	63.3 \pm 5.9	64.0 \pm 6.0	0.99	(0.98– 0.99)	-0.8; +0.7
VE, (L·min ⁻¹)	rest	10.0 \pm 2.4	9.6 \pm 2.3	0.84	(0.60 – 0.94)	-2.4; +3.1
	VT1	44.4 \pm 7.3	45.2 \pm 9.1	0.85	(0.61 – 0.94)	-9.9; +8.4
	VT2	102.8 \pm 14.3	101.6 \pm 16.2	0.89	(0.72 – 0.96)	-12.8; +15.2
	max	161.7 \pm 20.9	159.7 \pm 19.4	0.94	(0.82 – 0.98)	-18.1; +22.3
RR, (bpm)	rest	13.3 \pm 2.4	12.7 \pm 2.1	0.70	(0.34 – 0.88)	-2.8; +3.9
	VT1	26.6 \pm 5.9	27.0 \pm 6.3	0.93	(0.81 – 0.98)	-4.9; +4.0
	VT2	43.5 \pm 6.3	44.0 \pm 6.3	0.95	(0.87 – 0.98)	-4.2; +3.3
	max	61.9 \pm 6.6	62.0 \pm 6.3	0.94	(0.82 – 0.97)	-4.7; +4.8
Vt, (L)	rest	0.76 \pm 0.17	0.77 \pm 0.18	0.83	(0.56 – 0.94)	-0.20; +0.22
	VT1	1.70 \pm 0.33	1.70 \pm 0.31	0.89	(0.72 – 0.96)	-0.29; +0.30
	VT2	2.38 \pm 0.30	2.32 \pm 0.34	0.87	(0.67 – 0.96)	-0.25; +0.37
	max	2.62 \pm 0.33	2.59 \pm 0.34	0.92	(0.79 – 0.97)	-0.22; +0.29

SmO_2 : muscle oxygen saturation; $\dot{V}O_2$: oxygen consumption; VE: minute ventilation; RR: respiratory rate; Vt: tidal volume

Table 2. Average test-retest differences of physiological variables measured.

		Average test-retest differences	
		mean	(95% CI)
SmO_2 - <i>m. intercostales</i> (%)	rest	-0.8	(-3.7 – 2.0)
	VT1	1.1	(-2.4 – 4.6)
	VT2	1.4	(-2.2 – 5.0)
	max	-1.4	(-5.3 – 2.5)
SmO_2 - <i>m.vastus lateralis</i> (%)	VT1	0.6	(-0.8 – 2.0)
	VT2	0.1	(-1.8 – 2.0)
	max	0.1	(-1.4 – 1.4)
VO_2 (mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	rest	0.1	(-0.1 – 0.2)
	VT1	0.2	(-0.1 – 0.5)
	VT2	-0.2	(-0.4 – 0.1)
	max	-0.1	(-0.3 – 0.1)
VE (L·min ⁻¹)	rest	0.4	(-0.3 – 1.2)
	VT1	-1.0	(-3.5 – 1.4)
	VT2	1.4	(-2.5 – 5.4)
	max	2.1	(-3.6 – 7.9)
RR (bpm)	rest	0.5	(-0.4 – 1.5)
	VT1	-0.4	(-1.7 – 0.8)
	VT2	-0.5	(-1.5 – 0.6)
	max	0.1	(-1.3 – 1.4)
Vt (L)	rest	0.0	(-0.1 – 0.1)
	VT1	0.0	(-0.1 – 0.1)
	VT2	0.0	(-0.1 – 0.1)
	max	0.0	(-0.1 – 0.1)

SmO_2 : muscle oxygen saturation; $\dot{V}O_2$: oxygen consumption; VE: minute ventilation; RR: respiratory rate; Vt: tidal volume.

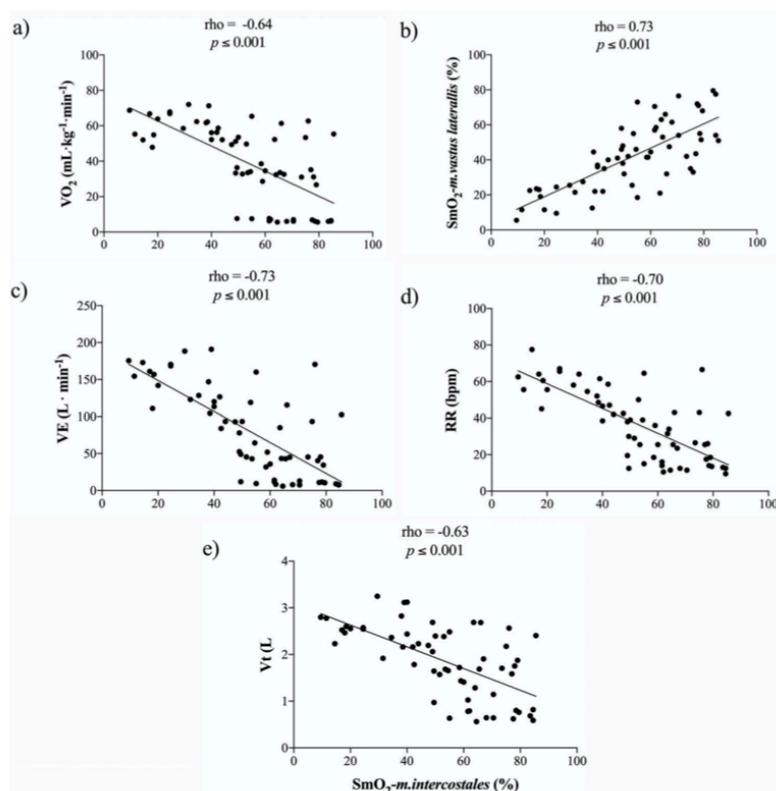


Figure 2. Correlation of $\text{SmO}_2\text{-}m.$ intercostales to (a) $\dot{V}\text{O}_2$ (oxygen consumption), (b) $\text{SmO}_2\text{-}m.$ vastus laterallis, (c) VE (minute ventilation), (d) RR (respiratory rate), and (e) V_t (tidal volume).

($\rho = -0.64$), VE ($\rho = -0.73$), RR ($\rho = -0.70$), and V_t ($\rho = -0.63$); see Figure 2.

Discussion

This investigation determined the reproducibility and variability of muscle oxygenation (SmO_2) in the *m. intercostales*, *m. vastus laterallis*, oxygen consumption ($\dot{V}\text{O}_2$), and ventilatory variables (VE, RR, and V_t) at different intensities of physical exercise (rest, VT1, VT2, and maximal) among marathon runners. The main finding regarding reliability was *good* to *excellent* for $\text{SmO}_2\text{-}m.$ intercostales, VE, and V_t ; *excellent* for $\text{SmO}_2\text{-}m.$ vastus laterallis and $\dot{V}\text{O}_2$; and *moderate* to *excellent* for RR. Thus, the variability of the measurements decreased as the exercise intensity and respiratory muscle work increased.

According to our knowledge, this is the first study to report oxygenation reliability data in respiratory muscles, both at rest and in physical exercise, and to catalogue ICC values as *good* in the resting phase and VT1, and *excellent* in the VT2 and maximal phases. This was also reflected in the breadth of the agreement limits (Table 1). The absence of a difference between the test and retest measurements was examined for the average value of the differences between the measurements, where the interval of $\text{SmO}_2\text{-}m.$ intercostales included

the null value. These results confer upon this evaluation the usefulness of estimating the WOB associated with habitual areas of physical training (VT1, VT2, and maximal), thus giving us a new tool to facilitate the objective prescription of exercise intensity. This was previously investigated in children by Moalla, *et al.* (Moalla, Dupont, Berthoin, & Ahmadi, 2005), who reported the feasibility of identifying the ventilatory threshold by ventilatory variables (*V-slope* method) and/or changes in $\text{SmO}_2\text{-}m.$ intercostales ($r = 0.87\text{--}0.94$). However, this is difficult to extrapolate to adults owing to factors such as high biological variability of cardio-ventilatory responses during physical exercise in a *non-steady state* (Power *et al.*, 2012), mode or type of physical exercise performed (Kennedy *et al.*, 2006), decreased muscle perfusion as a consequence of muscular contractions (Kataya-ma, Yoshitake, Watanabe, Akima, & Ishida, 2010), loss of SmO_2 signal due to differences in the position and/or magnitude of adipose tissue at the position of the device (van Beekvelt, Borghuis, van Engelen, Wevers, & Colier, 2001), and lack of information regarding the degree of concordance of SmO_2 in the respiratory musculature. These aspects provide SmO_2 in the respiratory musculature an open field to explore exercise sciences, reinforcing the need to discover reliability values for the reproducibility of the evaluation protocols used.

$\text{SmO}_2\text{-}m$. *intercostales* is inversely associated with $\dot{V}\text{O}_2$, VE, RR, and Vt, reinforcing the idea that the greater WOB during high intensity physical effort can be a limiting factor to consider. Further studies are required to determine if different ventilatory patterns have different impacts on the behaviour of respiratory muscle deoxygenation to subsequently evaluate changes because of respiratory training.

This investigation evaluated the reliability of ventilatory variables while athletes performed treadmill exercise, revealing greater data variability in the resting phase, mainly in RR, which improved to *excellent* as the exercise intensity increased ($\dot{V}\text{O}_2$; Table 1). In theory, running could cause greater variability of the evaluated data because unlike pedalling, where stability in the upper limbs on the handlebar and minute ventilation are attained mainly at the expense of the increase in tidal volume, running causes high RR values, and the upper limbs constantly oscillate, modifying the biomechanics of the excursion of the thorax (Power et al., 2012). This aspect may have interfered with the recording and collection of information from $\text{SmO}_2\text{-}m$. *intercostales*, which fortunately did not occur in our study, considering that the reliability of SmO_2 increased with the intensity of exercise. This could be attributed to the fact that the participants were experienced marathoners, with high $\dot{V}\text{O}_2\text{-peak}$ (Table 1). The attachment methods of the portable NIRS devices recommended by the manufacturer may have been another factor.

Regarding the statistical method used for ICC, the evidence is divergent regarding its use in reliability studies because although some authors mentioned its strengths (Koo & Li, 2016), others reported weaknesses due to shortcomings in the agreement values reported (Atkinson & Nevill, 1998). This was the reason for performing the Bland-Altman analysis to complement the reliability analysis when delivering agreement limits (Table 1). Moreover, the analysis of the mean of the differences (Table 2) revealed that the null value of all the evaluated variables is considered to be within the confidence interval, confirming that both measurements (test and retest) did not present significant differences.

One limitation of our study was the non-measurement of adipose tissue at the positioning sites of the portable NIRS devices. In this regard, the literature reports that greater adipose tissue affects the penetration of light from the source and thus the recording of data obtained by devices that use NIRS (Turner et al., 2013). In the case of Moxy, the penetration is maintained at approximately 2 cm (Austin et al., 2005; Crum et al., 2017), an aspect that allowed the non-presence of artefacts in the evaluation of respiratory musculature in the athletes of this study, given their low fat composition, as reflected in their BMI ($21.6 \pm 2.3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$). In future studies, it would be relevant to consider adipose tissue thickness, measured using a calliper, ultrasonography, or other methods, to assess the maximum thickness of the respiratory muscle and thus obtain adequate information. Another limitation is inherent to the repetitiveness of any maximal test carried until the subject's exhaustion. Although the volitional component in the cessation of exercise is not very controllable, we have assured, by means of the control of other physiological parameters, that a similar $\dot{V}\text{O}_2\text{-peak}$ has been reached in both trials (Poole & Jones, 2017).

In summary, from the data obtained in this study, we conclude that the reliability of SmO_2 for the *m. intercostales* of the marathon runners who performed incremental physical exercise on a treadmill was *good* at low intensity and *excellent* at higher intensity. In addition, $\text{SmO}_2\text{-}m$. *intercostales* was inversely associated with minute ventilation, respiratory rate, and tidal volume. The use of NIRS in respiratory muscles as a novel way to quantify the WOB associated with physical exertion has been examined. From this perspective, it is interesting to investigate deoxygenation behaviour with different ventilatory patterns developed in physical exercise and its possible modification by respiratory musculature training in the clinical and sports fields.

Acknowledgments

This study received financial support for editing and translating to the English language from Pontificia Universidad Católica de Chile.

Author Contribution Statement

FCB: protocol design, data analysis, manuscript redaction, final approval.
MER: measurements, data base management.
GH, DLI, MC, FC: protocol design, data analysis.
PG, ALF: data analysis, final approval.
LG: manuscript redaction, final approval.
GV: data analysis, manuscript redaction, final approval.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Felipe Contreras-Briceño  <http://orcid.org/0000-0002-0674-7506>
 Maximiliano Espinosa-Ramirez  <http://orcid.org/0000-0002-0840-1904>
 Gonzalo Hevia  <http://orcid.org/0000-0001-8306-0575>
 Diego Llambias  <http://orcid.org/0000-0001-6945-6928>
 Miguel Carrasco  <http://orcid.org/0000-0002-0245-8766>
 Francisco Cerda  <http://orcid.org/0000-0002-4833-2739>
 Antonio López-Fuenzalida  <http://orcid.org/0000-0003-4339-337X>
 Patricio García  <http://orcid.org/0000-0002-3870-5837>
 Luigi Gabrielli  <http://orcid.org/0000-0002-1551-7147>
 Ginés Viscor  <http://orcid.org/0000-0003-4942-2346>

References

- Aaron, E., Johnson, B., Seow, C., & Dempsey, J. (1992). Oxygen cost of exercise hyperpnea: Measurement. *Journal of Applied Physiology*, 72, 1810–1817.
- Atkinson, G., & Nevill, A. (1998). Statistical methods for assessing measurement error (reliability) in variables relevant to sports medicine. *Sports Medicine*, 26, 217–238.
- Austin, K., Daigle, K., Patterson, P., Cowman, J., Chelland, S., & Haymes, E. (2005). Reliability of near-infrared spectroscopy for determining muscle oxygen saturation during exercise. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, 76, 440–449.
- Bell, S., Saunders, M., Elborn, J., & Shale, D. (1996). Resting energy expenditure and oxygen cost of breathing in patients with cystic fibrosis. *Thorax*, 51, 126–131.
- Bland, J., & Altman, D. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 8, 307–310.
- Borg, G. (1982). Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 14, 377–381.

- Boushel, R., Langberg, H., Olesen, J., Gonzales-Alonzo, J., Bülow, J., & Kjaer, M. (2001). Monitoring tissue oxygen availability with near infrared spectroscopy (NIRS) in health and disease. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 11, 213–222.
- Crum, E., O'Connor, W., Van Loo, L., Valckx, M., & Stannard, S. (2017). Validity and reliability of the Moxy oxygen monitor during incremental cycling exercise. *European Journal of Sport Science*, 17, 1037–1043.
- Dempsey, J., Romer, L., Rodman, J., Miller, J., & Smith, C. (2006). Consequences of exercise-induced respiratory muscle work. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 151, 242–250.
- Dominelli, P., Archiza, B., Ramsook, A., Mitchell, R., Peters, C., Molgat-Seon, Y., ... Sheel, A. (2017). Effects of respiratory muscle work on respiratory and locomotor blood flow during exercise. *Experimental Physiology*, 102, 1535–1547.
- Giavarina, D. (2015). Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, 25, 141–151.
- Harriss, D., Macsween, A., & Atkinson, G. (2017). Standards for ethics in sport and exercise science research: 2018 update. *International Journal of Sports Medicine*, 38, 1126–1131.
- Iannetta, D., Qahtani, A., Mattioni, F., & Murias, J. (2017). The near-infrared spectroscopy-derived deoxygenated haemoglobin breaking-point is a repeatable measure that demarcates exercise intensity domains. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 20, 873–877.
- Katayama, K., Yoshitake, Y., Watanabe, K., Akima, H., & Ishida, K. (2010). Muscle deoxygenation during sustained and intermittent isometric exercise in hypoxia. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 42, 1269–1278.
- Kennedy, M., Haykowsky, M., Boliek, C., Esch, B., Scott, J., & Warburton, D. (2006). Regional muscle oxygenation differences in vastus lateralis during different modes of incremental exercise. *Dynamic Medicine : DM*, 5, 8.
- Koo, T., & Li, M. (2016). A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *Journal of Chiropractic Medicine*, 15, 155–163.
- Kowalchuk, J., Rossiter, H., Ward, S., & Whipp, B. (2002). The effect of resistive breathing on leg muscle oxygenation using near-infrared spectroscopy during exercise in men. *Experimental Physiology*, 87, 601–611.
- Legrand, R., Prieur, F., Marles, A., Nourry, C., Lazzari, S., Blondel, N., & Mucci, P. (2007). Respiratory muscle oxygenation kinetics: Relationships with breathing pattern during exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 28, 91–99.
- Levison, H., & Cherniack, R. (1968). Ventilatory cost of exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Applied Physiology*, 25, 21–27.
- Mancini, D., Bolinger, L., Li, H., Kendrick, K., Chance, B., & Wilson, J. (1994). Validation of near-infrared spectroscopy in humans. *Journal of Applied Physiology*, 77, 2740–2747.
- Moalla, W., Dupont, G., Berthoin, S., & Ahmaidi, S. (2005). Respiratory muscle deoxygenation and ventilatory threshold assessments using near infrared spectroscopy in children. *International Journal of Sports Medicine*, 26, 576–582.
- Mortola, J. (2019). How to breathe? Respiratory mechanics and breathing pattern. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 261, 48–54.
- Naranjo, J., Centeno, R., Galiano, D., & Beaus, M. (2005). A nomogram for assessment of breathing patterns during treadmill exercise. *British Journal of Sports Medicine*, 39, 80–83.
- Nicolò, A., Girardi, M., Bazzucchi, I., Felici, F., & Sacchetti, M. (2018). Respiratory frequency and tidal volume during exercise: Differential control and unbalanced interdependence. *Physiological Reports*, 6, 01–17.
- Perrey, S., & Ferrari, M. (2018). Muscle oximetry in sports science: A systematic review. *Sports Medicine*, 48, 597–616.
- Poole, D., & Jones, A. (2017). Measurement of the maximum oxygen uptake Vo2-max: Vo2-peak is no longer acceptable. *Journal of Applied Physiology*, 122, 997–1002.
- Power, G., Handrigan, G., & Basset, F. (2012). Ventilatory response during an incremental exercise test: A mode of testing effect. *European Journal of Sport Science*, 12, 491–498.
- Romer, L., Lovering, A., Haverkamp, H., Pegelow, D., & Dempsey, J. (2006). Effect of inspiratory muscle work on peripheral fatigue of locomotor muscles in healthy humans. *The Journal of Physiology*, 571, 425–439.
- Scheeren, T., Schober, P., & Schwarte, L. (2012). Monitoring tissue oxygenation by near infrared spectroscopy (NIRS): Background and current applications. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 26, 279–287.
- Tanaka, T., Basoudan, N., Melo, L., Wickerson, L., Brochard, L., Goligher, E., & Reid, W. D. (2018). Deoxygenation of inspiratory muscles during cycling, hyperpnoea and loaded breathing in health and disease: A systematic review. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 38, 554–565.
- Taylor, H., Buskirk, E., & Henschel, A. (1955). Maximal oxygen intake as an objective measure of cardio-respiratory performance. *Journal of Applied Physiology*, 8, 73–80.
- Thiel, C., Vogt, L., Himmelreich, H., Hübscher, M., & Banzer, W. (2011). Reproducibility of muscle oxygen saturation. *International Journal of Sports Medicine*, 32, 277–280.
- Turner, L., Tecklenburg-Lund, S., Chapman, R., Stager, J., Duke, J., & Mickleborough, T. (2013). Inspiratory loading and limb locomotor and respiratory muscle deoxygenation during cycling exercise. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 185, 506–514.
- van Beekvelt, M., Borghuis, M., van Engelen, B., Wevers, R., & Colier, W. (2001). Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. *Clinical Science*, 101, 21–28.
- Vella, C., Marks, D., & Robergs, R. (2006). Oxygen cost of ventilation during incremental exercise to VO2 max. *Respirology*, 11, 175–181.
- Vogiatzis, I., Andrianopoulos, V., Louvaris, Z., Cherouveim, E., Spetsioti, S., Vasilopoulou, M., & Athanasopoulos, D. (2011). Quadriceps muscle blood flow and oxygen availability during repetitive bouts of isometric exercise in simulated sailing. *Journal of Sports Sciences*, 29, 1041–1049.
- Vogiatzis, I., Athanasopoulos, D., Habazettl, H., Aliverti, A., Louvaris, Z., Cherouveim, E., ... Zakynthinos, S. (2010). Intercoastal muscle blood flow limitation during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182, 1105–1113.
- Vogiatzis, I., Athanasopoulos, D., Habazettl, H., Kuebler, W., Wagner, H., Roussos, C., ... Zakynthinos, S. (2009). Intercoastal muscle blood flow limitation in athletes during maximal exercise. *The Journal of Physiology*, 587, 3665–3677.

5. Discusión general

5 Discusión general

La literatura científica relacionada al estudio del ejercicio físico y su efecto oxidativo es categórica en sostener que el daño inducido dependerá de factores relacionados a características del ejercicio en sí mismo (tiempo, intensidad, cantidad o volumen), de los sujetos que lo realizan (sedentarios, físicamente activos, deportistas competitivos o *elite*), y de las condiciones ambientales en las cuales se desarrolle (altura, frío o calor, alta o baja humedad ambiental, presencia o no de contaminación e irritantes respiratorios, entre los más relevantes) (Jackson, 2005; Finaud et al., 2006; Gomes et al., 2012; He et al., 2016; Magherini et al., 2019). Al respecto, si bien los efectos dañinos a raíz de la alteración del estado redox inducido por ejercicio se ha estudiado principalmente en el sistema muscular (Nikolaidis et al., 2008; Powers & Jackson, 2008; Powers, Ji, et al., 2011), pues es el territorio en donde se aumenta en forma relevante el flujo sanguíneo y consumo de oxígeno a consecuencia de la mayor actividad contráctil asociada al gesto deportivo, también otros sistemas biológicos pueden verse afectados a consecuencia de las grandes modificaciones que sufren desde el estado reposo a máxima intensidad de esfuerzo físico. En este sentido, el sistema respiratorio también se puede afectar pues durante el ejercicio experimenta cambios en favor de disminuir el trabajo respiratorio y favorecer el intercambio gaseoso necesario para satisfacer la mayor demanda metabólica tisular. Así, el aumento en la ventilación pulmonar ($\dot{V}E$) (a consecuencia del incremento en la frecuencia respiratoria (Fr) y volumen corriente (Vc)), la dilatación de la vía aérea y de los vasos sanguíneos de la circulación menor, son factores que en sí mismos y sobretodo cuando ocurren en condiciones ambientales no favorables como el aire frío y/o seco, hipoxia, presencia de alérgenos y/o irritantes respiratorios, y material particulado, irritan la vía aérea, deshidratan el fluido de recubrimiento epitelial de la vía aérea, aumentan la osmolaridad del epitelio respiratorio, activan macrófagos alveolares y mecanismos de protección que producen liberación de RS locales y mediadores químicos relacionados a la procesos inflamatorios, factores que interactúan y exacerbaban el estado oxidativo respiratorio pudiendo desencadenar estrés oxidativo y dañar estructuralmente biomoléculas mencionadas en la sección anterior (Araneda et al., 2016; Couto et al., 2018; Lim & Nair, 2018; Magherini et al., 2019).

Uno de los métodos de recolección de muestras más usados para analizar la producción de estas RS y/o biomoléculas inflamatorias originadas en el sistema

respiratorio es la técnica de condensado de aire espirado (CAE) (Araneda et al., 2016; Horváth et al., 2017), pues destaca por ser un método no invasivo, portable, que permite la evaluación temporal, al poderse obtener múltiples muestras, y siendo no operador-dependiente (Horváth et al., 2005; Ahmadzai et al., 2013; Dodig & Čepelak, 2013). Considerando estos beneficios, la técnica del CAE ha permitido conocer el comportamiento de ciertos biomarcadores en diferentes contextos, especialmente en patologías respiratorias (Carraro et al., 2005; Liu & Thomas, 2005; Hoffmeyer et al., 2009; Papaioannou et al., 2011; de Lima et al., 2013; Horváth et al., 2017; Khoubnasabjafari et al., 2018; Mendes et al., 2019). Sin embargo, existen pocos estudios en donde a través de muestras de CAE se haya estudiado el efecto del ejercicio sobre el estado redox respiratorio en sujetos sanos. En este contexto, el grupo de investigación, previamente al desarrollo de esta tesis, había reportado como resultados algunos hallazgos relevantes a tener en cuenta: aumento de $[MDA]_{CAE}$ en condiciones de hipoxia en atletas ejercitados posterior a un protocolo de esfuerzo máximo en cicloergómetro (Araneda et al., 2005); aumento de $[H_2O_2]_{CAE}$ y $[NO_2^-]_{CAE}$ en normoxia en corredores habituados al entrenamiento aeróbico posterior a esfuerzos prolongados e intensos (21.1 y 42.2 km), y no así en esfuerzos intensos no prolongados (10 km) (Araneda et al., 2012); aumento de las mismas especies químicas reactivas en sujetos no habituados al entrenamiento posterior a un esfuerzo intenso no prolongado (10 km) (Araneda et al., 2014); y aumento en $[H_2O_2]_{CAE}$ y $[NO_2^-]_{CAE}$ en condiciones controladas de laboratorio en sujetos sanos no entrenados posterior sólo a 90 minutos de ejercicio aeróbico en cicloergómetro (y no a los 30 y 60 minutos) (Tuesta et al., 2016). A partir de estos resultados, se concluyó que la respuesta respiratoria frente al ejercicio respecto a la producción de especies químicas reactivas era dependiente de la duración y tipo de esfuerzo físico realizado, destacando ejercicios de intensidad moderada-alta ($>75-80\% \dot{V}O_2\text{-máx.}$); y a la habituación previa o no del sujeto evaluado (participantes físicamente inactivos o parcialmente entrenados presentaban mayor incremento de RS que los entrenados), confiriéndole a la $\dot{V}E$ total desarrollada en el ejercicio un factor relevante (quienes desarrollaban mayor $\dot{V}E$ total presentaban mayor producción de RS), lo que se reportó al evaluar en forma seriada a sujetos sanos no entrenados (Tuesta et al., 2016). A la vez, en todas las investigaciones en las cuales se encontró aumento de las RS evaluadas ($[H_2O_2]_{CAE}$ y $[NO_2^-]_{CAE}$) también se reportó asociación entre los cambios de ambos marcadores (Δ), lo que sugiere que o hay un origen molecular común para ambos, o que el aumento en uno de ellos induce aumentos en la otra (dependencia). Así, y con la finalidad de complementar los resultados

del grupo de investigación, el doctorando de esta tesis evaluó principalmente la influencia de las condiciones ambientales sobre la producción inducida por ejercicio de RS y parámetros inflamatorios de origen respiratorio en atletas habituados a mantener una $\dot{V}E$ elevada, y por tanto, con una posible mayor cantidad y calidad de defensas antioxidantes respiratorias que pudiesen evitar el establecimiento de estrés oxidativo. Para indagar si los cambios químicos evaluados impactaban en cambios de la función respiratoria, se complementaron las evaluaciones con pruebas clínicas de espirometría. A su vez, se incorporó la medición a una mayor extensión temporal (24 horas posterior al ejercicio), con la finalidad de caracterizar la dimensión del efecto del ejercicio en el comportamiento de RS evaluadas y su impacto en pruebas de función pulmonar.

El primer estudio comparó en nadadores competitivos y crónicamente expuestos a aumentar la $\dot{V}E$ en condiciones ambientales con irritantes respiratorios (cloro y sus derivados), cómo el realizar dos ejercicios distintos de igual duración e intensidad afectaba el estado redox del sistema respiratorio, con la finalidad de evaluar la influencia de irritantes respiratorios sobre la producción de RS inducidas por ejercicio. Así, con un diseño *cross-over* los participantes completaron un protocolo de nadar 3.500-m en piscina *indoor* tratada con cloro, versus correr 10-km al aire libre. Ambos protocolos de ejercicio fueron realizados a una intensidad cercana al umbral ventilatorio 2 (*ventilatory threshold 2*, VT2) o punto de compensación respiratoria ($\pm 80-85\% \dot{V}O_{2-max.}$), lo que implicó mantener una $\dot{V}E$ total elevada en ambos ejercicios. En este sentido, la natación en piscinas *indoor* ha mostrado ser beneficiosa para pacientes con asma, pues el ambiente húmedo y cálido propio del *indoor* disminuye la deshidratación de vía aérea y el broncoespasmo inducido por ejercicio (Goodman & Hays, 2008). En este estudio, se consideró una piscina tratada con cloro, pues era el ambiente al cual los participantes estaban acostumbrados a entrenar (± 8 a 10 años de experiencia en natación) y es el medio químico más usado en la actualidad para controlar la contaminación del agua de las piscinas (Evans, 2005). Sin embargo, existe controversia respecto a las ventajas de este tratamiento del agua, pues se ha asociado a enfermedades alérgicas, injuria pulmonar, y asma ocupacional (Martin et al., 2003; White & Martin, 2010). En sujetos con exposición prolongada al medioambiente de piscinas *indoor* (ej. salvavidas y nadadores de competición) se ha reportado alteración en la permeabilidad del epitelio respiratorio, estrés oxidativo, e inflamación de la vía aérea (Carbonnelle et al., 2002, 2008; Gougoura et al., 2007; Bougault et al., 2009, 2010, 2018; Font-Ribera et al., 2011; Bougault & Boulet, 2012; Fornander et al., 2013). Al respecto, la literatura propone como

mecanismos relacionados en la injuria respiratoria a que una vez inhalado el cloro, éste reacciona con el vapor de agua presente en la vía aérea y se hidrata, formando ácido clorhídrico (HCl, $\pm 20\text{-}25\%$) y ácido hipocloroso (HOCl, $\pm 75\text{-}80\%$), especies químicas que junto al cloro pueden reaccionar con RS producidas en el mismo sistema respiratorio a consecuencia de la mayor actividad de éste durante el ejercicio físico (ej. O_2^- y/o H_2O_2 , y/o OH^-), y otros factores como el óxido nítrico (NO^\bullet) a consecuencia de la vasodilatación local y mayor activación de la enzima iNOS, formando nuevas y más “agresivas” RS como el peroxinitrito (ONOO^-). Así, el impacto de la natación intensa y prolongada en piscinas *indoor* tratadas con cloro dependerá de la concentración de estos irritantes respiratorios y del tiempo de exposición o $\dot{V}\text{E}$ alcanzada en el ejercicio (White & Martin, 2010; Rundell et al., 2015). Todas estas RS producidas pueden contribuir a alterar el estado redox local y dañar el sistema respiratorio por medio de edema, inflamación, constricción inmediata y reactividad persistente de las vías respiratorias. La figura 8 muestra un resumen con los posibles mecanismos implicados.

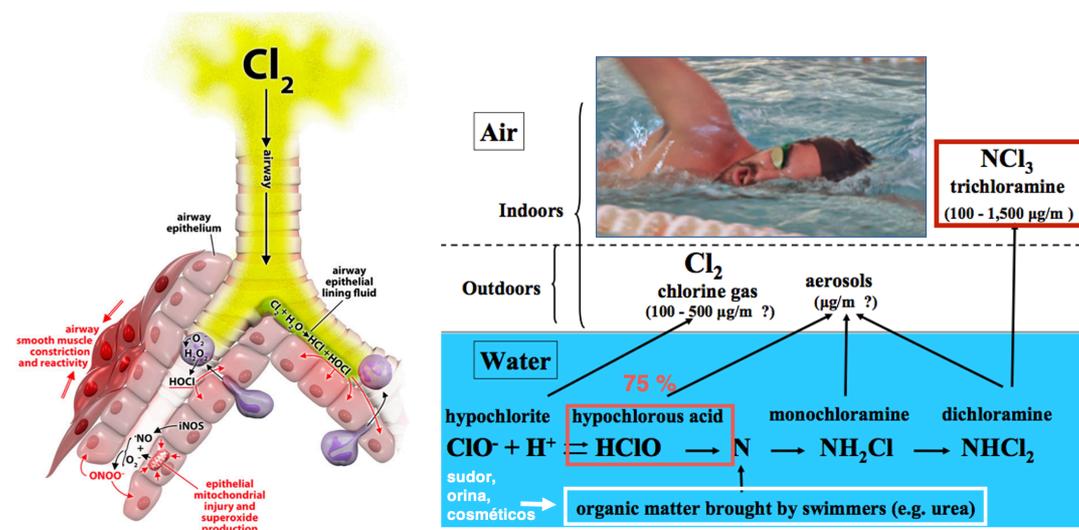


Figura 8. Mecanismos implicados en la formación de especies reactivas respiratorias durante la natación.

El cloro gaseoso (Cl_2) al ser inhalado y reaccionar con el vapor de agua presente en la vía aérea, forma ácido hidrocórico (HCl, $\pm 20\text{-}25\%$) y ácido hipocloroso (HOCl, $\pm 75\text{-}80\%$). Tanto el Cl_2 como los ácidos formados pueden reaccionar con RS producidas por células del epitelio respiratorio e inducidas por el ejercicio (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) alterando el estado redox, y produciendo nuevas y más dañinas RS (ONOO^- y OH^-). Además, otras fuentes de nitrógeno, como el sudor y orina, también pueden reaccionar con los ácidos formados, aumentando los derivados del cloro (cloraminas), exacerbando la alteración redox respiratoria. Figuras modificadas de White & Martin (2010) (White & Martin, 2010) y Bernard (2007) (Bernard, 2007).

En nadadores de competición, pocos estudios han evaluado mediante CAE el impacto del ejercicio físico en la producción de RS. Es así como Font-Rivera et al. (2010) no observó cambios en $[\text{8-Iso-P}]_{\text{CAE}}$ en adultos sanos después de nadar 40-min

(Font-Ribera et al., 2010), al igual que Bougault et al. (2010) en salvavidas expuestos pasivamente por 2 horas al ambiente de piscinas tratadas con cloro (Bougault et al., 2010). Sin embargo, durante una sesión de natación a intensidad moderada en el mismo ambiente y durante el mismo tiempo, se encontró aumento de $[8\text{-Iso-P}]_{\text{CAE}}$ en nadadores de competición, lo cual se correlacionó de forma directa con la exposición previa al mismo ambiente (Bougault et al., 2010, 2018). Fernández et al. (2013) encontró aumento de la permeabilidad pulmonar al encontrar aumento en las proteínas de células Clara posterior a 20 sesiones de natación en piscinas tratadas con cloro en comparación a las tratadas con ozono (Fernández-Luna et al., 2013). Posteriormente, Morissette et al. (2016) al evaluar posterior a nadar a intensidad moderada durante 105 min en piscina *indoor* a nadadores recreativos encontró aumento de $[8\text{-Iso-P}]_{\text{CAE}}$ (Morissette et al., 2016). Los hallazgos observados sugieren que el desarrollo y características del ejercicio físico le confieren mayor efecto oxidativo sobre la vía aérea a la inhalación de cloro y/o sus derivados; sin embargo, aún no está claro que sucede en sujetos habituados a entrenamientos de alta intensidad, duración, y exposición prolongada al medioambiente de piscinas tratadas con cloro. Así, nuestra hipótesis inicial era que en nadadores seleccionados el nadar 3.500-m aumentaría más las RS y parámetros inflamatorios evaluados ($[\text{H}_2\text{O}_2]$, $[\text{NO}_2]$, y pH, respectivamente) que el correr 10-km al aire libre. Sin embargo, el análisis de los resultados nos evidenció lo contrario para las RS, no encontrando cambios en el pH y parámetros de función pulmonar (espirometría). Es decir, el correr 10-km al aire libre aumentó la concentración de las RS, aspecto concordante con los datos de estudios previos realizados por el grupo de investigación, lo que nos hizo inferir que en condiciones propias de piscinas *indoor*, dentro de las cuales se encuentra la alta humedad y temperatura ambiental, los efectos dañinos de la inhalación de irritantes respiratorios, como el cloro y/o sus derivados, en sujetos habituados al ejercicio e inhalación de estas RS parecen no expresarse, por lo que el evitar la deshidratación y aumento de osmolaridad de la vía aérea a raíz del aumento de \dot{V}_E en el ejercicio físico intenso y prolongado resultaría un factor clave para evitar la alteración redox respiratoria.

Al revisar la literatura disponible, no encontramos estudios que hayan evaluado en forma aislada la influencia de la humedad y temperatura ambiental sobre la producción de RS inducidas por ejercicio, factores que en el primer estudio hizo inferir que podrían haber “protegido” la vía aérea de los nadadores. Sólo existe información respecto al efecto oxidativo del ejercicio físico en condiciones de disminución de temperatura en el cual se reportó en sujetos sanos el aumento en $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{CAE}}$ posterior a

50 minutos de carrera a intensidad moderada ($\pm 80\%$ FC máxima) en condiciones de frío y humedad relativa moderada ($-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 77% , respectivamente) en comparación a condiciones normales ($18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 44%) (Marek et al., 2013). Así, el siguiente estudio a desarrollar en esta tesis tuvo como finalidad evaluar el efecto aislado de la humedad relativa (h.r) sobre la producción de RS inducidas por ejercicio en sujetos sanos físicamente activos. Para ello se realizó un estudio cuasi-experimental descriptivo y longitudinal con diseño randomizado, en donde en condiciones controladas de laboratorio, se evaluó la influencia de la alta humedad relativa (90% -h.r vs. 40% -h.r) sobre los valores de la $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{CAE}}$, $[\text{NO}_2]_{\text{CAE}}$, y $[\text{NO}_2]_{\text{Plasma}}$ posterior a 60 minutos de bicicleta a intensidad alta (70% de vatios máximos alcanzados en la evaluación de $\dot{V}\text{O}_2\text{-máx.}$) en ciclistas recreativos. Para controlar los valores de h.r se construyó una cámara semihermética en donde a través de un humidificador ultrasónico se mantuvieron controlados los valores programados de h.r, y estable la temperatura ambiental en $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El análisis de los resultados demostró que la alta humedad relativa efectivamente “protegió” a los participantes respecto al efecto oxidativo del protocolo de ejercicio seleccionado, pues la $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{CAE}}$, $[\text{NO}_2]_{\text{CAE}}$, y razón $[\text{NO}_2]_{\text{CAE}}/[\text{NO}_2]_{\text{Plasma}}$ fue menor en 90% -h.r vs. 40% -h.r. Además, otorgó un efecto de broncodilatación mantenida incluso posterior a 80 minutos de finalizado el ejercicio, como lo demostró el análisis clínico de la función pulmonar evaluada con espirometría y reflejada en los valores de VEF_1 y $\text{FEF}_{25-75\%}$. Además, y con la finalidad de estandarizar los cambios en la RS producidas respecto al sexo y la diferencia en la $\dot{V}\text{E}$ total desarrollada en el ejercicio, se encontró diferencias entre las distintas condiciones de h.r (90% vs. 40%) al comparar el cambio en la concentración de RS evaluadas respecto al área de superficie corporal. Este último análisis es interesante pues permite en futuros estudios disminuir las diferencias por sexo respecto al análisis del efecto del ejercicio físico, y por ende de la $\dot{V}\text{E}$ total desarrollada, sobre la producción de RS de origen respiratorio. Según nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que reporta en forma aislada el efecto protector de la alta humedad sobre la alteración del estado redox respiratorio asociado al ejercicio físico, lo que fue destacado también por los revisores de la revista científica en la evaluación por pares del artículo original.

En ambos estudios se encontraron asociaciones entre $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{CAE}}$ y $[\text{NO}_2]_{\text{CAE}}$, como también entre sus diferencias (Δ), lo que hace inferir o que hay un origen molecular común para ambos o que el aumento en uno de ellos induce aumentos en la otra RS (grado de dependencia). Estos resultados son concordantes con los de investigaciones

previas al desarrollo de esta tesis (Araneda et al., 2012, 2014; Tuesta et al., 2016), por lo que nuevas investigaciones en el contexto del ejercicio físico y análisis de muestras de CAE son necesarias para evaluar este comportamiento, como puede ser el uso de alopurinol y su efecto inhibitorio sobre la enzima xantino oxidasa y su producción de H_2O_2 , entre otros.

Otro aspecto interesante en ambos estudios y concordante con resultados de investigaciones previas, es la asociación entre las RS evaluadas (principalmente $[H_2O_2]_{CAE}$) y la $\dot{V}E$ total desarrollada en los protocolos de ejercicio, sobretodo en condiciones ambientales “no protectoras” que favorecen la deshidratación del fluido de recubrimiento de células epiteliales de la vía aérea y aumento de osmolaridad del epitelio respiratorio, aspecto que puede ser minimizado al evaluar mujeres dado las características antropométricas y respuestas respiratorias al ejercicio diferentes respecto a los hombres (Sheel et al., 2004; Guenette et al., 2007, 2009; Harms & Rosenkranz, 2008), y que puede ser estandarizado al considerar el área de superficie corporal (Mosteller, 1987). En este sentido, interesante es que nuevas investigaciones incorporen mediciones directas de la $\dot{V}E$ durante el ejercicio desarrollado, con la finalidad de conocer valores de las presiones *end-tidal* de O_2 y CO_2 que permitan estimar si existen cambios en estos gases a consecuencia de cambios en condiciones ambientales; además, permitirá conocer aspectos asociados a la eficiencia ventilatoria que podrían estar involucrados con la $\dot{V}E$ total desarrollada (J. Davis et al., 2006; Sun et al., 2002).

En el contexto de que la $\dot{V}E$ total desarrollada en el ejercicio físico ha mostrado en forma reiterada asociación con el incremento en las RS evaluadas, se realizó un último estudio en donde se evaluó la confiabilidad de un método no invasivo, portable y sencillo que permite la evaluación del trabajo muscular respiratorio (*work of breathing*, WOB) durante el ejercicio físico, pues la actividad contráctil de este grupo muscular junto a la indemnidad del sistema respiratorio (vía aérea y parénquima pulmonar) son los que permiten desarrollar elevados valores de $\dot{V}E$ total. El propósito de contar con un método confiable que evalúe este parámetro permitirá ampliar la línea de investigación de esta tesis, pues futuras investigaciones deberán determinar si el patrón o estrategia respiratoria desarrollado por los sujetos evaluados, a similar valor de $\dot{V}E$ alcanzada, afecta la producción de RS respiratorias en virtud del WOB asociado, es decir, si aspectos implicados en la mecánica respiratoria como los cambios en la Fr y V_c son claves en afectar el estado redox local. Así, se diseñó un estudio *test-retest* que evaluó la confiabilidad

de la medición de oxigenación (saturación muscular de oxígeno, SmO_2) en músculos respiratorios (SmO_2 -*m.intercostales*) como reflejo del costo energético (WOB) asociado a la $\dot{V}E$ en ejercicio físico máximo en corredores de maratón. A su vez, se evaluó la oxigenación en músculos locomotores (SmO_2 -*m.vastus laterallis*) para estimar el impacto de la carga periférica del protocolo de ejercicio. La SmO_2 se evaluó mediante un dispositivo no invasivo (MOXY™, Fortiori Design Inc, EE.UU) que ha mostrado adecuada validez y confiabilidad en musculatura locomotora, pero aún no en la respiratoria (Feldmann et al., 2019). Interesantemente, la medición del WOB durante la prueba de $\dot{V}O_2$ -máx. en corredores competitivos de maratón mostró una *good* (>0.6 y ≤ 0.8) confiabilidad a intensidades baja (10% (etapa reposo) y 54% (etapa VT1) de $\dot{V}O_2$ -máx.) y *excellent* (>0.8) a intensidades altas de ejercicio en cinta rodante (81% (etapa VT2) a 100% de $\dot{V}O_2$ -máx.). Además, la SmO_2 -*m.intercostales* se asoció inversamente con $\dot{V}E$, Fr, V_c y $\dot{V}O_2$ -máx., es decir, a mayores valores de variables ventilatorias, menor fue la oxigenación en músculos intercostales, lo que se debe a una menor relación entrega/extracción de O_2 local y se asocia a la mayor actividad contráctil respiratoria o WOB.

Según la búsqueda de información realizada, no existen estudios que hayan analizado mediante muestras de CAE el efecto de diferentes niveles de WOB sobre la producción de RS respiratorias en sujetos sanos sin factores patológicos que pudiesen exacerbar la alteración del estado redox local, pudiendo ser una opción reportarlo a través de la medición de SmO_2 en músculos respiratorios. Así, es necesario realizar nuevas investigaciones para determinar cómo la estrategia ventilatoria usada por deportistas en los protocolos de ejercicio, reflejada en los cambios de Fr y V_c y así en el WOB, afecta la producción de RS y parámetros inflamatorios respiratorios, otorgándole a la presente línea de investigación un enfoque en la mecánica de la ventilación y su efecto sobre el estado redox respiratorio.

Otro de los factores relevantes a discutir en los resultados de esta tesis, son los relacionados a los parámetros inflamatorios evaluados (pH en CAE) y su repercusión en pruebas de función pulmonar (espirometría). En el primer estudio (artículo I) no se encontró diferencias entre los protocolos de ejercicios (nadar vs. correr) incluso a las 24 horas en ambos parámetros; mientras en el segundo estudio (artículo II) se encontró broncodilatación mantenida posterior a 80 minutos de completado el ejercicio en ambiente con alta humedad (90% vs. 40%), lamentablemente no se realizó la medición experimental del pH en muestras de CAE. Al respecto, la literatura reporta que en

pacientes con condiciones habituales de inflamación del sistema respiratorio, como el asma y EPOC, el pH_{CAE} es más bajo (ácido) que en sujetos sanos (Papaioannou et al., 2011; Aldakheel et al., 2016), al igual que posterior a la inhalación de material particulado (de Lima et al., 2013; Qin et al., 2019), siendo similar a lo encontrado en atletas posterior a ejercicios intensos y prolongados (Marek et al., 2009; Araneda et al., 2012; Bikov et al., 2014); sin embargo, lo contrario sucede cuando el ejercicio se desarrolla a intensidades leves a moderada (Riediker & Danuser, 2007) sugiriendo así que el impacto del ejercicio sobre este parámetro depende del estado redox previo del sujeto evaluado, y de las características del estímulo, siendo para nuestro caso la intensidad y duración a la cual se desarrolla el ejercicio físico. Interesante es complementar estas mediciones con otros marcadores de inflamación como citoquinas en muestras de CAE (ej. IL-6) (Lim & Nair, 2018) o de alteración de la permeabilidad del epitelio respiratorio a través de neumoproteínas en muestras de plasma (ej. proteínas del surfactante pulmonar tipo D y células Clara) (Kurowski et al., 2014); como también el registro con mayor temporalidad a través de mediciones a las 48 y 72 horas de finalizado el protocolo de ejercicio. Ahora bien, respecto a las pruebas de función pulmonar con espirometría, la evidencia muestra disminución del VEF_1 o CVF, o de ambos, en condiciones con exposición crónica a irritantes respiratorios, relacionando los cambios funcionales a modificaciones estructurales que conllevan un largo plazo para su adaptación, siendo éste un aspecto que es difícil de reportar en sujetos sanos como deportistas y que además son expuestos de manera aguda a condiciones irritativas, por lo que resulta relevante continuar con estos registros en futuras investigaciones. Quizás el siguiente paso debería consistir en intentar describir el comportamiento de parámetros asociados a la constricción de la vía aérea pequeña, la que puede ser más sensible a los cambios agudos (ej. FEF_{25-75}) (Marseglia et al., 2007).

Por último, es necesario mencionar que el método de muestreo usado en esta tesis (CAE) presenta algunas limitaciones, reportándose en la literatura la gran variabilidad de los resultados, y dudas respecto al origen de las sustancias condensadas, ya que si bien la mayoría proviene del fluido de recubrimiento del epitelio respiratorio y alveolos, no se descarta la posible contaminación en boca, orofaringe y sistema digestivo superior, por lo que para que el análisis de los resultados sea confiable, es necesario la medición de duplicados, o idealmente, triplicados de muestras, tal como se realizó en la presente tesis, y reportar en los informes indicadores estadísticos de dispersión (ej. coeficiente de

variación) (González-Mangado, 2005; Horváth et al., 2005; de Lema et al., 2005; Ahmadzai et al., 2013; Dodig & Čepelak, 2013; Khoubnasabjafari et al., 2018).

En resumen, los resultados obtenidos en los estudios desarrollados en la presente tesis requieren ser continuados y proyectar nuevas investigaciones orientadas a:

- i) Evaluar la influencia de otras condiciones ambientales, como la hipoxia y la presencia de material particulado, en la producción de especies reactivas inducidas por ejercicio físico.
- ii) Evaluar nuevos parámetros asociados a la inflamación del sistema respiratorio y alteración de la permeabilidad del epitelio de la vía aérea y pulmonar, como citoquinas y neumoproteínas (surfactante tipo D y células Clara), en muestras de CAE y plasma sanguíneo.
- iii) Evaluar a una mayor temporalidad el efecto del ejercicio, ideal con mediciones a las 24, 48 y 72 horas.
- iv) Evaluar el efecto de la mecánica respiratoria reflejado en la estrategia ventilatoria y costo de respiración de músculos respiratorios sobre la producción de RS y parámetros inflamatorios inducidos por ejercicio.
- v) Analizar el estado redox y estrés oxidativo respiratorio posterior a protocolos de ejercicio evaluando tanto sustancias oxidativas como antioxidantes locales, que pueden verse afectados tanto por el desarrollo agudo de ejercicio físico como a consecuencia de respuestas crónicas.

6. Conclusiones

6 Conclusiones

Las conclusiones de esta tesis son las siguientes:

1. En nadadores crónicamente expuestos a irritantes respiratorios derivados de la reacción del cloro y sus derivados (cloraminas) con el vapor de agua, el análisis de muestras de CAE muestran que a las 24 horas posterior al desarrollo de dos ejercicios diferentes comparables en intensidad y duración, y desarrollados en condiciones ambientales habituales, las especies químicas reactivas evaluadas (H_2O_2 , NO_2^-) disminuyeron al nadar 3500-m en una piscina *indoor* tratada con cloro, y aumentaron al correr 10-km al aire libre.
2. En los nadadores, ambos protocolos de ejercicios no ocasionaron cambios en los volúmenes y capacidades pulmonares evaluados mediante espirometría, tanto a los 20 minutos como a las 24 horas posteriores.
3. En ciclistas recreativos, la alta humedad relativa ambiental (90%) previene la producción respiratoria inducida por ejercicio de las especies reactivas evaluadas en muestras de CAE (H_2O_2 , NO_2^-).
4. Los ciclistas mantuvieron la broncodilatación posterior al ejercicio, la que fue evaluada por cambios en volúmenes y flujos respiratorios mediante espirometría, incluso a los 80 minutos posterior a la finalización del protocolo de ejercicio en la condición de alta humedad relativa ambiental.
5. A través del método simple, no invasivo y portable de obtención de muestras respiratorias de CAE se obtiene una variedad importante de especies químicas reactivas y parámetros inflamatorios de origen respiratorio, facilitando la evaluación temporal, a través de la obtención seriada de muestras, de los cambios inducidos por ejercicio.
6. En corredores de maratón, la evaluación de la saturación muscular de oxígeno en músculos respiratorios (*m. intercostales*) mediante NIRS es un método novedoso que

permite cuantificar el trabajo muscular asociado a la respiración durante el esfuerzo físico (*work of breathing*, WOB).

7. La confiabilidad de la medición de $\text{SmO}_2\text{-}m.\text{intercostales}$ en corredores de maratón durante la prueba de $\dot{V}\text{O}_2\text{-máx.}$ es buena a baja intensidad y mejora a excelente a alta intensidad de esfuerzo físico.
8. La $\text{SmO}_2\text{-}m.\text{intercostales}$ en corredores de maratón se asoció inversamente con las variables ventilatorias de ventilación pulmonar ($\dot{V}\text{E}$), frecuencia respiratoria (Fr) y volumen corriente ($V\text{c}$).

7. Bibliografía

7 Bibliografía

- Aaron, E., Johnson, B., Seow, C., & Dempsey, J. (1992). Oxygen cost of exercise hyperpnea: measurement. *Journal of Applied Physiology*, *72*(5), 1810–1817.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.5.1810>
- Ahmadzai, H., Huang, S., Hettiarachchi, R., Lin, J., Thomas, P., & Zhang, Q. (2013). Exhaled breath condensate: A comprehensive update. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *51*, 1343–1361. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0593>
- Al-Hashem, F. (2012). Potential roles for vitamins E and C in combination in modulating exhaustive swimming and high altitude-associated lung injury in rats. *Saudi Medical Journal*, *33*, 367–374. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22485230/>
- Aldakheel, F., Thomas, P., Bourke, J., Matheson, M., Dharmage, S., & Lowe, A. (2016). Relationships between adult asthma and oxidative stress markers and pH in exhaled breath condensate: A systematic review. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *71*, 741–757. <https://doi.org/10.1111/all.12865>
- Altan, M., Atukeren, P., Mengi, M., Metin, G., Cakar, L., & Gumustas, K. (2009). Influence of intermittent hypobaric exposure on SOD and TBARS levels in trained rats. *Chinese Journal of Physiology*, *52*, 106–112.
<https://doi.org/10.4077/CJP.2009.AMH027>
- Alves, J., Pereira, L., Monteiro, I., Dos Santos, L., Ferraz, A., Loureiro, A., Lima, C., Leal-Cardoso, J., Carvalho, D., Fortunato, R., & Ceccatto, V. (2020). Strenuous acute exercise induces slow and fast twitch-dependent NADPH oxidase expression in rat skeletal muscle. *Antioxidants*, *09*, 01–16.
<https://doi.org/10.3390/antiox9010057>
- Araneda, O., Carbonell, T., & Tuesta, M. (2016). Update on the mechanisms of pulmonary inflammation and oxidative imbalance induced by exercise. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 01–23.
<https://doi.org/10.1155/2016/4868536>
- Araneda, O., García, C., Lagos, N., Quiroga, G., Cajigal, J., Salazar, M., & Behn, C. (2005). Lung oxidative stress as related to exercise and altitude. Lipid peroxidation evidence in exhaled breath condensate: A possible predictor of acute mountain sickness. *European Journal of Applied Physiology*, *95*, 383–390.
<https://doi.org/10.1007/s00421-005-0047-y>

- Araneda, O., Guevara, A., Contreras, C., Lagos, N., & Berral, F. (2012). Exhaled breath condensate analysis after long distance races. *International Journal of Sports Medicine*, *33*, 955–961. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1316314>
- Araneda, O., & Tuesta, M. (2012). Lung oxidative damage by hypoxia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*, 01–21. <https://doi.org/10.1155/2012/856918>
- Araneda, O., Urbina-Stagno, R., Tuesta, M., Haichelis, D., Alvear, M., Salazar, M., & García, C. (2014). Increase of pro-oxidants with no evidence of lipid peroxidation in exhaled breath condensate after a 10-km race in non-athletes. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *70*, 107–115. <https://doi.org/10.1007/s13105-013-0285-0>
- Arnér, E., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, *267*, 6102–6109. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x>
- Avissar, N., Finkelstein, J., Horowitz, S., Willey, J., Coy, E., Frampton, M., Watkins, R., Khullar, P., Xu, Y., & Cohen, H. (1996). Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *270*, 173–182. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.270.2.1173>
- Bast, A., Haenen, G., & Doelman, C. (1991). Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, *91*, 02–13. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90278-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90278-6)
- Battelli, M., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016). Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 01–08. <https://doi.org/10.1155/2016/3527579>
- Bell, S., Saunders, M., Elborn, J., & Shale, D. (1996). Resting energy expenditure and oxygen cost of breathing in patients with cystic fibrosis. *Thorax*, *51*(2), 126–131. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8711641>
- Bernard, A. (2007). Chlorination products: Emerging links with allergic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, *14*, 1771–1782. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627515>
- Berndt, C., Lillig, C., & Holmgren, A. (2007). Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: Implications for diseases in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *292*, 1227–1236. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01162.2006>
- Bikov, A., Gajdócsi, R., Huszár, É., Szili, B., Lázár, Z., Antus, B., Losonczy, G., &

- Horváth, I. (2010). Exercise induced - Exercise increases exhaled breath condensate cysteinyl leukotriene concentration in asthmatic patients. *Journal of Asthma*, *47*, 1057–1062. <https://doi.org/10.1080/02770903.2010.512690>
- Bikov, A., Galffy, G., Tamasi, L., Bartusek, D., Antus, B., Losonczy, G., & Horvath, I. (2014). Exhaled breath condensate pH decreases during exercise-induced bronchoconstriction. *Respirology*, *19*, 563–569. <https://doi.org/10.1111/resp.12248>
- Biswas, S., & Rahman, I. (2009). Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*, 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.07.001>
- Bonini, M., & Silvers, W. (2018). Exercise-induced bronchoconstriction: Background, prevalence, and sport considerations. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, *38*, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2018.01.007>
- Bonsignore, M., Morici, G., Riccobono, L., Profita, M., Bonanno, A., Paternò, A., Di Giorgi, R., Chimenti, L., Abate, P., Mirabella, F., Vignola, A., & Bonsignore, G. (2003). Airway cells after swimming outdoors or in the sea in nonasthmatic athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *35*, 1146–1152. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000074581.08023.25>
- Bonsignore, M., Morici, G., Vignola, A., Riccobono, L., Bonanno, A., Profita, M., Abate, P., Scichilone, N., Amato, G., Bellia, V., & Bonsignore, G. (2003). Increased airway inflammatory cells in endurance athletes: What do they mean? *Clinical and Experimental Allergy*, *33*, 14–21. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01557.x>
- Bougault, V., & Boulet, L. (2012). Airway dysfunction in swimmers. *British Journal of Sports Medicine*, *46*, 402–406. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090821>
- Bougault, V., Odashiro, P., Turmel, J., Orain, M., Laviolette, M., Joubert, P., & Boulet, L. (2018). Changes in airway inflammation and remodelling in swimmers after quitting sport competition. *Clinical and Experimental Allergy*, *48*, 1748–1751. <https://doi.org/10.1111/cea.13257>
- Bougault, V., Turmel, J., & Boulet, L. (2010). Bronchial challenges and respiratory symptoms in elite swimmers and winter sport athletes: Airway hyperresponsiveness in asthma: Its measurement and clinical significance. *Chest*, *138*, 31–37. <https://doi.org/10.1378/chest.09-1689>
- Bougault, V., Turmel, J., Levesque, B., & Boulet, L. (2009). The respiratory health of swimmers. *Sports Medicine*, *39*, 295–312. <https://doi.org/10.2165/00007256->

200939040-00003

- Boushel, R., Langberg, H., Olesen, J., Gonzales-Alonzo, J., Bülow, J., & Kjaer, M. (2001). Monitoring tissue oxygen availability with near infrared spectroscopy (NIRS) in health and disease. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *11*(4), 213–222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476426>
- Brandes, R., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, *76*, 208–226. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
- Cadenas, E., & Davies, K. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, *29*, 222–230. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)
- Carbonnelle, S., Bernard, A., Doyle, I., Grutters, J., & Francaux, M. (2008). Fractional exhaled NO and serum pneumoproteins after swimming in a chlorinated pool. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *40*, 1472–1476. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181733159>
- Carbonnelle, S., Francaux, M., Doyle, I., Dumont, X., De Burbure, C., Morel, G., Michel, O., & Bernard, A. (2002). Changes in serum pneumoproteins caused by short-term exposures to nitrogen trichloride in indoor chlorinated swimming pools. *Biomarkers*, *07*, 464–478. <https://doi.org/10.1080/13547500210166612>
- Carraro, S., Corradi, M., Zanconato, S., Alinovi, R., Pasquale, M., Zacchello, F., & Baraldi, E. (2005). Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes are increased in children with exercise-induced bronchoconstriction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *115*, 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.043>
- Cavalcante De Sá, M., Nakagawa, N., Saldiva De André, C., Carvalho-Oliveira, R., De Santana Carvalho, T., Nicola, M., De André, P., Nascimento Saldiva, P., & Vaisberg, M. (2016). Aerobic exercise in polluted urban environments: Effects on airway defense mechanisms in young healthy amateur runners. *Journal of Breath Research*, *10*, 01–09. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/10/4/046018>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, *59*, 527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Chevion, M., Berenshtein, E., & Stadtman, E. (2000). Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research*, *33*, 99–108. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191280/>

- Chimenti, L., Morici, G., Paternò, A., Bonanno, A., Vultaggio, M., Bellia, V., & Bonsignore, M. (2009). Environmental conditions, air pollutants, and airway cells in runners: A longitudinal field study. *Journal of Sports Sciences*, *27*, 925–935. <https://doi.org/10.1080/02640410902946493>
- Chimenti, L., Morici, G., Paternò, A., Santagata, R., Bonanno, A., Profita, M., Riccobono, L., Bellia, V., & Bonsignore, M. (2010). Bronchial epithelial damage after a half-marathon in nonasthmatic amateur runners. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *298*, 857–862. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00053.2010>
- Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature*, *174*, 689–691. <https://doi.org/10.1038/174689a0>
- Couto, M., Kurowski, M., Moreira, A., Bullens, D., Carlsen, K., Delgado, L., Kowalski, M., & Seys, S. (2018). Mechanisms of exercise-induced bronchoconstriction in athletes: Current perspectives and future challenges. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *73*, 08–16. <https://doi.org/10.1111/all.13224>
- Cross, C., Van der Vliet, A., O'Neill, C., Louie, S., & Halliwell, B. (1994). Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environmental Health Perspectives*, *102*, 185–191. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s10185>
- Crum, E., O'Connor, W., Van Loo, L., Valckx, M., & Stannard, S. (2017). Validity and reliability of the Moxy oxygen monitor during incremental cycling exercise. *European Journal of Sport Science*, *17*(8), 1037–1043. <https://doi.org/10.1080/17461391.2017.1330899>
- D'Andrea, A., Formisano, T., Riegler, L., Scarafilo, R., America, R., Martone, F., di Maio, M., Russo, M., Bossone, E., Galderisi, M., & Calabrò, R. (2017). Acute and chronic response to exercise in athletes: The “supernormal heart.” In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 999, pp. 21–41). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4307-9_2
- Da Cunha, M., Da Cunha, A., Ferreira, G., Baladão, M., Savio, L., Reichel, C., Kessler, A., Netto, C., & Wyse, A. (2013). The effect of exercise on the oxidative stress induced by experimental lung injury. *Life Sciences*, *92*, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.12.005>
- Davis, J., Sorrentino, K., Ninness, E., Pham, P., Dorado, S., & Costello, K. (2006). Test-retest reliability for two indices of ventilatory efficiency measured during cardiopulmonary exercise testing in healthy men and women. *Clinical Physiology and*

- Functional Imaging*, 26, 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.2006.00674.x>
- Davis, M., & Montpetit, A. (2018). Exhaled breath condensate: An update. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38, 667–678. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2018.06.002>
- de Lema, J., González, M., Vigil, L., & Casan, P. (2005). Exhaled breath condensate: Standardized collection of samples from healthy volunteers. *Archivos de Bronconeumología*, 41, 584–586. [https://doi.org/10.1016/s1579-2129\(06\)60287-5](https://doi.org/10.1016/s1579-2129(06)60287-5)
- de Lima, T., Kazama, C., Koczulla, A., Hiemstra, P., Macchione, M., Godoy Fernandes, A., Santos, U., Bueno-Garcia, M., Zanetta, D., Saldiva de André, C., Saldiva, P., & Nakagawa, N. (2013). pH in exhaled breath condensate and nasal lavage as a biomarker of air pollution-related inflammation in street traffic-controllers and office-workers. *Clinics*, 68, 1488–1494. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(12\)03](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(12)03)
- de Sousa, C., Sales, M., Rosa, T., Lewis, J., de Andrade, R., & Simões, H. (2017). The antioxidant effect of exercise: A systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, 47, 277–293. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0566-1>
- Dempsey, J., Romer, L., Rodman, J., Miller, J., & Smith, C. (2006). Consequences of exercise-induced respiratory muscle work. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 151(2–3), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2005.12.015>
- Di Meo, S., Napolitano, G., & Venditti, P. (2019). Mediators of physical activity protection against ROS-linked skeletal muscle damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 01–38. <https://doi.org/10.3390/ijms20123024>
- Dillard, C., Litov, R., Savin, W., Dumelin, E., & Tappel, A. (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology*, 45, 927–932. <https://doi.org/10.1152/japopl.1978.45.6.927>
- Dodig, S., & Čepelak, I. (2013). Exhaled breath condensate: From an analytical point of view. *Biochemia Medica*, 23, 281–295. <https://doi.org/10.11613/BM.2013.034>
- Dominelli, P., Archiza, B., Ramsook, A., Mitchell, R., Peters, C., Molgat-Seon, Y., Henderson, W., Koehle, M., Boushel, R., & Sheel, A. (2017). Effects of respiratory muscle work on respiratory and locomotor blood flow during exercise. *Experimental Physiology*, 102(11), 1535–1547. <https://doi.org/10.1113/EP086566>
- Effros, R., Hoagland, K., Bosbous, M., Castillo, D., Foss, B., Dunning, M., Gare, M.,

- Lin, W., & Feng, S. (2002). Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *165*, 663–669.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.5.2101018>
- Evans, R. (2005). Chlorine: State of the art. *Lung*, *183*, 151–167.
<https://doi.org/10.1007/s00408-004-2530-3>
- Feldmann, A., Schmitz, R., & Erlacher, D. (2019). Near-infrared spectroscopy-derived muscle oxygen saturation on a 0% to 100% scale: Reliability and validity of the Moxy monitor. *Journal of Biomedical Optics*, *24*, 01–11.
<https://doi.org/10.1117/1.jbo.24.11.115001>
- Fernández-Luna, Á., Gallardo, L., Plaza-Carmona, M., García-Unanue, J., Sánchez-Sánchez, J., Felipe, J., Burillo, P., & Ara, I. (2013). Respiratory function and changes in lung epithelium biomarkers after a short-training intervention in chlorinated vs. ozone indoor pools. *PLoS ONE*, *08*, 01–06.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068447>
- Ferreira, L., & Laitano, O. (2016). Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, *98*, 18–28.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.011>
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, *36*, 327–358. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>
- Font-Ribera, L., Kogevinas, M., Zock, J., Gómez, F., Barreiro, E., Nieuwenhuijsen, M., Fernandez, P., Lourencetti, C., Pérez-Olabarría, M., Bustamante, M., Marcos, R., Grimalt, J., & Villanueva, C. (2010). Short-term changes in respiratory biomarkers after swimming in a chlorinated pool. *Environmental Health Perspectives*, *118*, 1538–1544. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001961>
- Font-Ribera, L., Villanueva, C., Nieuwenhuijsen, M., Zock, J., Kogevinas, M., & Henderson, J. (2011). Swimming pool attendance, asthma, allergies, and lung function in the avon longitudinal study of parents and children cohort. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *183*, 582–588.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201005-0761OC>
- Fornander, L., Ghafouri, B., Lindahl, M., & Graff, P. (2013). Airway irritation among indoor swimming pool personnel: Trichloramine exposure, exhaled NO and protein profiling of nasal lavage fluids. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *86*, 571–580. <https://doi.org/10.1007/s00420-012-0790-4>

- Forster, H., Haouzi, P., & Dempsey, J. (2012). Control of breathing during exercise. *Comprehensive Physiology*, *02*, 743–777. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100045>
- Frederiks, W., & Bosch, K. (1995). The role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion damage of rat liver. *Histology and Histopathology*, *10*, 111–116. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7756731/>
- Garber, C., Blissmer, B., Deschenes, M., Franklin, B., Lamonte, M., Lee, I., Nieman, D., & Swain, D. (2011). Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *43*, 1334–1359. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318213fefb>
- Gomes, E., Silva, A., & Oliveira, M. (2012). Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*, 01–12. <https://doi.org/10.1155/2012/756132>
- Gomez-Cabrera, M., Domenech, E., & Viña, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.001>
- Gómez-Cabrera, M., Pallardó, F., Sastre, J., Viña, J., & Garcia Del Moral, L. (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *Journal of the American Medical Association*, *289*, 2503–2504. <https://doi.org/10.1001/jama.289.19.2503-b>
- Gomez-Cabrera, M., Viña, J., & Ji, L. (2009). Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: Implications for muscle health. *Physician and Sportsmedicine*, *37*, 116–123. <https://doi.org/10.3810/psm.2009.12.1749>
- González-Mangado, N. (2005). Analysis of exhaled breath condensate: A technique with a future? *Archivos de Bronconeumología*, *41*, 540–541. [https://doi.org/10.1016/s1579-2129\(06\)60279-6](https://doi.org/10.1016/s1579-2129(06)60279-6)
- Goodman, M., & Hays, S. (2008). Asthma and swimming: A meta-analysis. *Journal of Asthma*, *45*, 639–647. <https://doi.org/10.1080/02770900802165980>
- Gougoura, S., Nikolaidis, M., Kostaropoulos, I., Jamurtas, A., Koukoulis, G., & Kouretas, D. (2007). Increased oxidative stress indices in the blood of child swimmers. *European Journal of Applied Physiology*, *100*, 235–239. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0423-x>
- Granger, D., & Kviety, P. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The

- evolution of a concept. *Redox Biology*, 6, 524–551.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>
- Guenette, J., Querido, J., Eves, N., Chua, R., & William Sheel, A. (2009). Sex differences in the resistive and elastic work of breathing during exercise in endurance-trained athletes. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 297, 166–175. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00078.2009>
- Guenette, J., Witt, J., McKenzie, D., Road, J., & Sheel, A. (2007). Respiratory mechanics during exercise in endurance-trained men and women. *Journal of Physiology*, 581, 1309–1322. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.126466>
- Halliwell, B., Clement, M., & Long, L. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486, 10–13. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9)
- Halliwell, Barry, & Gutteridge, J. M. C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. In *Free Radicals in Biology and Medicine*.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hampton, M., Kettle, A., & Winterbourn, C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92, 3007–3017.
https://doi.org/10.1182/blood.v92.9.3007.421k47_3007_3017
- Harms, C., & Rosenkranz, S. (2008). Sex differences in pulmonary function during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 40, 664–668.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181621325>
- Hatao, H., Oh-Ishi, S., Itoh, M., Leeuwenburgh, C., Ohno, H., Ookawara, T., Kishi, K., Yagyū, H., Nakamura, H., & Matsuoka, T. (2006). Effects of acute exercise on lung antioxidant enzymes in young and old rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127, 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.12.008>
- He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C., Yang, W., & Zuo, L. (2016). Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. *Frontiers in Physiology*, 07, 01–10.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00486>
- Heffner, J., & Repine, J. (1989). Pulmonary strategies of antioxidant defense. *American Review of Respiratory Disease*, 140, 531–554.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm/140.2.531>
- Heinicke, I., Boehler, A., Rechsteiner, T., Bogdanova, A., Jelkmann, W., Hofer, M., Rawlings, P., Araneda, O., Behn, C., Gassmann, M., & Heinicke, K. (2009). Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate. *European Journal of Applied Physiology*,

- 106, 599–604. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1014-9>
- Henkel, R. (2011). Leukocytes and oxidative stress: Dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13, 43–52.
<https://doi.org/10.1038/aja.2010.76>
- Hoffmeyer, F., Raulf-Heimsoth, M., & Bruning, T. (2009). Exhaled breath condensate and airway inflammation. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 09, 16–22.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32831d8144>
- Horváth, I., Barnes, P., Loukides, S., Sterk, P., Högman, M., Olin, A., Amann, A., Antus, B., Baraldi, E., Bikov, A., Boots, A., Bos, L., Brinkman, P., Bucca, C., Carpagnano, G., Corradi, M., Cristescu, S., De Jongste, J., Dinh-Xuan, A., ... Vink, T. (2017). A European Respiratory Society technical standard: Exhaled biomarkers in lung disease. *European Respiratory Journal*, 49, 01–26.
<https://doi.org/10.1183/13993003.00965-2016>
- Horváth, I., Hunt, J., Barnes, P. J., Alving, K., Antczak, A., Baraldi, E., Becher, G., van Beurden, W. J. C., Corradi, M., Dekhuijzen, R., Dweik, R. A., Dwyer, T., Effros, R., Erzurum, S., Gaston, B., Gessner, C., Greening, A., Ho, L. P., Hohlfeld, J. M., ... Vaughan, J. (2005). Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unresolved questions. In *European Respiratory Journal* (Vol. 26, pp. 523–548). <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00029705>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 01–09. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Iannetta, D., Qahtani, A., Mattioni, F., & Murias, J. (2017). The near-infrared spectroscopy-derived deoxygenated haemoglobin breaking-point is a repeatable measure that demarcates exercise intensity domains. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 20(9), 873–877. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2017.01.237>
- Jackson, M. (2005). Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 2285–2291. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1773>
- Khoubnasabjafari, M., Rahimpour, E., & Jouyban, A. (2018). Exhaled breath condensate as an alternative sample for drug monitoring. *Bioanalysis*, 10, 61–64.
<https://doi.org/10.4155/bio-2017-0205>
- Khurana, S., Piche, M., Hollingsworth, A., Venkataraman, K., & Tai, T. (2013). Oxidative stress and cardiovascular health: Therapeutic potential of polyphenols.

- Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91, 198–212.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0252>
- Kippelen, P., & Anderson, S. (2012). Airway injury during high-level exercise. *British Journal of Sports Medicine*, 46, 385–390. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090819>
- Kippelen, P., Anderson, S., & Hallstrand, T. (2018). Mechanisms and biomarkers of exercise-induced bronchoconstriction. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38, 165–182. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2018.01.008>
- Kirschvink, N., Smith, N., Fiévez, L., Bougnet, V., Art, T., Degand, G., Marlin, D., Roberts, C., Génicot, B., Lindsey, P., & Lekeux, P. (2010). Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of healthy and heaves-affected horses. *Equine Veterinary Journal*, 34, 563–571.
<https://doi.org/10.2746/042516402776180223>
- Knobloch, H., Becher, G., Decker, M., & Reinhold, P. (2008). Evaluation of H₂O₂ and pH in exhaled breath condensate samples: Methodical and physiological aspects. *Biomarkers*, 13, 319–341. <https://doi.org/10.1080/13547500701831440>
- Kowalchuk, J., Rossiter, H., Ward, S., & Whipp, B. (2002). The effect of resistive breathing on leg muscle oxygenation using near-infrared spectroscopy during exercise in men. *Experimental Physiology*, 87(5), 601–611.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481935>
- Kraus, W., Powell, K., Haskell, W., Janz, K., Campbell, W., Jakicic, J., Troiano, R., Sprow, K., Torres, A., & Piercy, K. (2019). Physical activity, all-cause and cardiovascular mortality, and cardiovascular disease. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 51, 1270–1281. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001939>
- Kujala, U. (2009). Evidence on the effects of exercise therapy in the treatment of chronic disease. *British Journal of Sports Medicine*, 43, 550–555.
<https://doi.org/10.1136/bjism.2009.059808>
- Kurowski, M., Jurczyk, J., Jarzebska, M., Moskwa, S., Makowska, J., Kryzstofiak, H., & Kowalski, M. (2014). Association of serum Clara cell protein CC16 with respiratory infections and immune response to respiratory pathogens in elite athletes. *Respiratory Research*, 15, 01–10. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-45>
- Legrand, R., Prieur, F., Marles, A., Nourry, C., Lazzari, S., Blondel, N., & Mucci, P. (2007). Respiratory muscle oxygenation kinetics: relationships with breathing pattern during exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 28(2), 91–99.

- <https://doi.org/10.1055/s-2006-924056>
- Levison, H., & Cherniack, R. (1968). Ventilatory cost of exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Applied Physiology*, *25*(1), 21–27.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1968.25.1.21>
- Lim, H., & Nair, P. (2018). Airway Inflammation and Inflammatory Biomarkers. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *39*, 56–63.
<https://doi.org/10.1055/s-0037-1606217>
- Lin, W., Yang, S., Chen, K., Huang, C., & Lee, N. (2005). Protective effects of L-arginine on pulmonary oxidative stress and antioxidant defenses during exhaustive exercise in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, *26*, 992–999.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00155.x>
- Liu, J., & Thomas, P. (2005). Exhaled breath condensate as a method of sampling airway nitric oxide and other markers of inflammation. *Medical Science Monitor*, *11*, 53–62.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049390/?from_single_result=LIU+and+THOMAS+2005+EXHALED+BREATH
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, *66*, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., & Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological Chemistry*, *395*, 203–230.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0241>
- Magherini, F., Fiaschi, T., Marzocchini, R., Mannelli, M., Gamberi, T., Modesti, P., & Modesti, A. (2019). Oxidative stress in exercise training: The involvement of inflammation and peripheral signals. *Free Radical Research*, *53*, 1155–1165.
<https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1697438>
- Mancini, D., Bolinger, L., Li, H., Kendrick, K., Chance, B., & Wilson, J. (1994). Validation of near-infrared spectroscopy in humans. *Journal of Applied Physiology*, *77*(6), 2740–2747. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.6.2740>
- Marek, E., Platen, P., Volke, J., Mückenhoff, K., & Marek, W. (2009). Hydrogen peroxide release and acid-base status in exhaled breath condensate at rest and after maximal exercise in young, healthy subjects. *European Journal of Medical Research*, *14*, 134–139. <https://doi.org/10.1186/2047-783X-14-S4-134>
- Marek, E., Volke, J., Mückenhoff, K., Platen, P., & Marek, W. (2013). Exercise in cold air and hydrogen peroxide release in exhaled breath condensate. *Advances in*

- Experimental Medicine and Biology*, 756, 169–177. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4549-0_22
- Marnett, L. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361–370. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.361>
- Marnett, L. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 181–182, 219–222. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00448-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00448-1)
- Marseglia, G., Cirillo, I., Vizzaccaro, A., Klersy, C., Tosca, M., Rosa, M., Marseglia, A., Licari, A., Leone, M., & Ciprandi, G. (2007). Role of forced expiratory flow at 25-75% as an early marker of small airways impairment in subjects with allergic rhinitis. *Allergy and Asthma Proceedings*, 28, 74–78. <https://doi.org/10.2500/aap.2007.28.2920>
- Martin, J., Campbell, H., Iijima, H., Gautrin, D., Malo, J., Eidelman, D., Hamid, Q., & Maghni, K. (2003). Chlorine-induced injury to the airways in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168, 568–574. <https://doi.org/10.1164/rccm.200201-021OC>
- Mendes, F., Paciência, I., Ferreira, A., Martins, C., Rufo, J., Silva, D., Cunha, P., Farraia, M., Moreira, P., Delgado, L., Soares, M., & Moreira, A. (2019). Development and validation of exhaled breath condensate microRNAs to identify and endotype asthma in children. *PLoS ONE*, 14, 01–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224983>
- Menegali, B., Nesi, R., Souza, P., Silva, L., Silveira, P., Valença, S., & Pinho, R. (2009). The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 22, 567–573. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2009.08.003>
- Mercken, E., Hageman, G., Schols, A., Akkermans, M., Bast, A., & Wouters, E. (2005). Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172, 994–1001. <https://doi.org/10.1164/rccm.200411-1580OC>
- Morissette, M., Murray, N., Turmel, J., Milot, J., Boulet, L., & Bougault, V. (2016). Increased exhaled breath condensate 8-isoprostane after a swimming session in competitive swimmers. *European Journal of Sport Science*, 16, 569–576. <https://doi.org/10.1080/17461391.2015.1063702>
- Mortola, J. (2019). How to breathe? respiratory mechanics and breathing pattern. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 261, 48–54.

- <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.12.005>
- Moskovitz, J., Yim, M., & Chock, P. (2002). Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *397*, 354–359. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2692>
- Mosteller, R. (1987). Simplified calculation of body-surface area. *New England Journal of Medicine*, *317*, 1098. <https://doi.org/10.1056/NEJM198710223171717>
- Naranjo, J., Centeno, R., Galiano, D., & Beaus, M. (2005). A nomogram for assessment of breathing patterns during treadmill exercise. *British Journal of Sports Medicine*, *39*(2), 80–83. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2003.009316>
- Niess, A., & Simon, P. (2007). Response and adaptation of skeletal muscle to exercise: The role of reactive oxygen species. *Frontiers in Bioscience*, *12*, 4826–4838. <https://doi.org/10.2741/2431>
- Niki, E. (2008). Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors*, *34*, 171–180. <https://doi.org/10.1002/biof.5520340208>
- Nikolaidis, M., Jamurtas, A., Paschalis, V., Fatouros, I., Koutedakis, Y., & Kouretas, D. (2008). The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: Magnitude and time-course considerations. *Sports Medicine*, *38*, 579–606. <https://doi.org/10.2165/00007256-200838070-00005>
- Nowak, D., Kalucka, S., Bialasiewicz, P., & Król, M. (2001). Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*, 178–186. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00457-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00457-3)
- Oja, P., Kelly, P., Pedisic, Z., Titze, S., Bauman, A., Foster, C., Hamer, M., Hillsdon, M., & Stamatakis, E. (2017). Associations of specific types of sports and exercise with all-cause and cardiovascular-disease mortality: A cohort study of 80 306 British adults. *British Journal of Sports Medicine*, *51*, 812–817. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-096822>
- Olivo, C., Miyaji, E., Oliveira, M., Almeida, F., Lourenço, J., Abreu, R., Arantes, P., Lopes, F., & Martins, M. (2014). Aerobic exercise attenuates pulmonary inflammation induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Applied Physiology*, *117*, 998–1007. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00290.2014>
- Packer, L., Cadenas, E., & Davies, K. (2008). Free radicals and exercise: An introduction. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*, 123–125. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.031>
- Papaioannou, A., Loukides, S., Minas, M., Kontogianni, K., Bakakos, P.,

- Gourgoulianis, K., Alchanatis, M., Papiris, S., & Kostikas, K. (2011). Exhaled breath condensate pH as a biomarker of COPD severity in ex-smokers. *Respiratory Research, 12*, 01–07. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-67>
- Pavord, I., Pizzichini, M., Pizzichini, E., & Hargreave, F. (1997). The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax, 52*, 498–501. <https://doi.org/10.1136/thx.52.6.498>
- Pedersen, B., & Saltin, B. (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 16*, 03–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2006.00520.x>
- Pedersen, B., & Saltin, B. (2015). Exercise as medicine - Evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports, 25*, 01–72. <https://doi.org/10.1111/sms.12581>
- Pedersen, L., Lund, T., Mølgaard, E., Kharitonov, S., Barnes, P., & Backer, V. (2009). The acute effect of swimming on airway inflammation in adolescent elite swimmers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 123*, 502–504. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.11.039>
- Perrey, S., & Ferrari, M. (2018). Muscle oximetry in sports science: a systematic review. *Sports Medicine, 48*(3), 597–616. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0820-1>
- Phaniendra, A., Jestadi, D., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, sources, targets, and their Implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry, 30*, 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017*, 01–13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Power, G., Handrigan, G., & Basset, F. (2012). Ventilatory response during an incremental exercise test: A mode of testing effect. *European Journal of Sport Science, 12*(6), 491–498. <https://doi.org/10.1080/17461391.2011.573580>
- Powers, S., DeRuisseau, K., Quindry, J., & Hamilton, K. (2004). Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences, 22*, 81–94. <https://doi.org/10.1080/0264041031000140563>
- Powers, S., & Hamilton, K. (1999). Antioxidants and exercise. *Clinics in Sports Medicine, 18*, 525–536. [https://doi.org/10.1016/S0278-5919\(05\)70166-6](https://doi.org/10.1016/S0278-5919(05)70166-6)
- Powers, S., & Jackson, M. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular

- mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, *88*, 1243–1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>
- Powers, S., Ji, L., Kavazis, A., & Jackson, M. (2011). Reactive oxygen species: Impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*, *01*, 941–969. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100054>
- Powers, S., Nelson, W., & Hudson, M. (2011). Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*, 942–950. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.009>
- Prigol, M., Luchese, C., & Nogueira, C. (2009). Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. *Cell Biochemistry and Function*, *27*, 216–222. <https://doi.org/10.1002/cbf.1559>
- Pucsok, J., Györe, I., Argay, K., Huszár, É., BaráT, E., Pucsok, J., & Horváth, I. (2007). Effect of exercise on levels of cyclo-oxygenase mediators in exhaled breath condensate in elite athletes. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, *47*, 223–227.
- Qin, F., Yang, Y., Wang, S., Dong, Y., Xu, M., Wang, Z., & Zhao, J. (2019). Exercise and air pollutants exposure: A systematic review and meta-analysis. *Life Sciences*, *218*, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.036>
- Radak, Z., Ishihara, K., Tekus, E., Varga, C., Posa, A., Balogh, L., Boldogh, I., & Koltai, E. (2017). Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. *Redox Biology*, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.015>
- Reddy, K., Kumar, T., Prasad, M., & Reddanna, P. (1998). Pulmonary lipid peroxidation and antioxidant defenses during exhaustive physical exercise: The role of vitamin E and selenium. *Nutrition*, *14*, 448–451. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(98\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(98)00016-1)
- Reichhold, S., Neubauer, O., Bulmer, A., Knasmüller, S., & Wagner, K. (2009). Endurance exercise and DNA stability: Is there a link to duration and intensity? *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, *682*, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.02.002>
- Reichhold, S., Neubauer, O., Ehrlich, V., Knasmüller, S., & Wagner, K. (2008). No acute and persistent DNA damage after an ironman triathlon. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *17*, 1913–1919. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0293>
- Reichhold, S., Neubauer, O., Hoelzl, C., Stadlmayr, B., Valentini, J., Ferk, F., Kundi,

- M., Knasmüller, S., & Wagner, K. (2009). DNA damage in response to an Ironman triathlon. *Free Radical Research*, *43*, 753–760.
<https://doi.org/10.1080/10715760903040628>
- Reis Gonçalves, C., Reis Gonçalves, C., de Almeida, F., dos Santos Lopes, F., dos Santos Durão, A., dos Santos, F., da Silva, L., Marcourakis, T., Castro-Faria-Neto, H., Vieira, R., & Dolhnikoff, M. (2012). Protective effects of aerobic exercise on acute lung injury induced by LPS in mice. *Critical Care*, *16*, 01–11.
<https://doi.org/10.1186/cc11807>
- Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., & Aggarwal, B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, *49*, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Ricciardolo, F., Sterk, P., Gaston, B., & Folkerts, G. (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiological Reviews*, *84*, 731–765.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2003>
- Riediker, M., & Danuser, B. (2007). Exhaled breath condensate pH is increased after moderate exercise. *Journal of Aerosol Medicine: Deposition, Clearance, and Effects in the Lung*, *20*, 13–18. <https://doi.org/10.1089/jam.2006.0567>
- Roberts, C., Barnard, R., Jasman, A., & Balon, T. (1999). Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *277*, 390–394. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.2.e390>
- Romer, L., Lovering, A., Haverkamp, H., Pegelow, D., & Dempsey, J. (2006). Effect of inspiratory muscle work on peripheral fatigue of locomotor muscles in healthy humans. *The Journal of Physiology*, *571*(Pt 2), 425–439.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.099697>
- Rundell, K., Anderson, S., Sue-Chu, M., Bougault, V., & Boulet, L. (2015). Air quality and temperature effects on exercise-induced bronchoconstriction. *Comprehensive Physiology*, *05*, 579–610. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130013>
- Salim, S. (2016). Oxidative stress: A potential link between emotional wellbeing and immune response. *Current Opinion in Pharmacology*, *29*, 70–76.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.06.006>
- Schamberger, A., Schiller, H., Fernandez, I., Sterclova, M., Heinzelmann, K., Hennen, E., Hatz, R., Behr, J., Vašáková, M., Mann, M., Eickelberg, O., & Staab-Weijnitz, C. (2016). Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease. *Scientific Reports*, *6*, 01–15.

- <https://doi.org/10.1038/srep29952>
- Scheeren, T., Schober, P., & Schwarte, L. (2012). Monitoring tissue oxygenation by near infrared spectroscopy (NIRS): background and current applications. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 26(4), 279–287. <https://doi.org/10.1007/s10877-012-9348-y>
- Schröder, K. (2019). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Dosis facit venenum. *Experimental Physiology*, 104, 447–452. <https://doi.org/10.1113/EP087125>
- Sheel, A., Richards, J., Foster, G., & Guenette, J. (2004). Sex differences in respiratory exercise physiology. *Sports Medicine*, 34, 567–579. <https://doi.org/10.2165/00007256-200434090-00002>
- Sheel, A., & Romer, L. (2012). Ventilation and Respiratory Mechanics. *Comprehensive Physiology*, 02, 1093–1142. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100046>
- Stadtman, E., & Levine, R. (2006). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
- Steinbacher, P., & Eckl, P. (2015). Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules*, 05, 356–377. <https://doi.org/10.3390/biom5020356>
- Sue, G., Ho, Z., & Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 1543–1552. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026>
- Sun, X., Hansen, J., Garatachea, N., Storer, T., & Wasserman, K. (2002). Ventilatory efficiency during exercise in healthy subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166, 1443–1448. <https://doi.org/10.1164/rccm.2202033>
- Tanaka, T., Basoudan, N., Melo, L., Wickerson, L., Brochard, L., Goligher, E., & Reid, W. D. (2018). Deoxygenation of inspiratory muscles during cycling, hyperpnoea and loaded breathing in health and disease: a systematic review. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 38(4), 554–565. <https://doi.org/10.1111/cpf.12473>
- Thiel, C., Vogt, L., Himmelreich, H., Hübscher, M., & Banzer, W. (2011). Reproducibility of muscle oxygen saturation. *International Journal of Sports Medicine*, 32(4), 277–280. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1269922>
- Treberg, J., Quinlan, C., & Brand, M. (2010). Hydrogen peroxide efflux from muscle mitochondria underestimates matrix superoxide production - a correction using glutathione depletion. *FEBS Journal*, 277, 2766–2778.

- <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07693.x>
- Tuesta, M., Alvear, M., Carbonell, T., García, C., Guzmán-Venegas, R., & Araneda, O. (2016). Effect of exercise duration on pro-oxidants and pH in exhaled breath condensate in humans. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72, 353–360. <https://doi.org/10.1007/s13105-016-0486-4>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., & Loridas, S. (2013). Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 3886–3907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>
- Vella, C., Marks, D., & Robergs, R. (2006). Oxygen cost of ventilation during incremental exercise to VO₂ max. *Respirology*, 11(2), 175–181. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00825.x>
- Viña, Amparo Gimeno, Juan S, J. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats: Role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 49, 539–544. <https://doi.org/10.1080/15216540050167098>
- Vogiatzis, I., Athanasopoulos, D., Habazetl, H., Aliverti, A., Louvaris, Z., Cherouveim, E., Wagner, H., Roussos, C., Wagner, P., & Zakynthinos, S. (2010). Intercostal muscle blood flow limitation during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(9), 1105–1113. <https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0172OC>
- Vogiatzis, I., Athanasopoulos, D., Habazetl, H., Kuebler, W., Wagner, H., Roussos, C., Wagner, P., & Zakynthinos, S. (2009). Intercostal muscle blood flow limitation in athletes during maximal exercise. *The Journal of Physiology*, 587(14), 3665–3677. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171694>
- Wagner, K., Reichhold, S., & Neubauer, O. (2011). Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1229, 115–123. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06106.x>
- Walsh, N., & Whitham, M. (2006). Exercising in environmental extremes: A greater threat to immune function? *Sports Medicine*, 36, 941–976. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636110-00003>
- White, C., & Martin, J. (2010). Chlorine gas inhalation: Human clinical evidence of toxicity and experience in animal models. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7,

- 257–263. <https://doi.org/10.1513/pats.201001-008SM>
- Winterbourn, C., & Kettle, A. (2013). Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxidants and Redox Signaling*, *18*, 642–660. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4827>
- Wolkoff, P. (2018). Indoor air humidity, air quality, and health: An overview. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *221*, 376–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.01.015>
- Wong, H., Dighe, P., Mezera, V., Monternier, P., & Brand, M. (2017). Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *Journal of Biological Chemistry*, *292*, 16804–16809. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.789271>
- Xiong, Y., Uys, J., Tew, K., & Townsend, D. (2011). S-Glutathionylation: From molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxidants and Redox Signaling*, *15*, 233–270. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3540>
- Yang, Y., Bazhin, A., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*, *32*, 249–270. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>
- Ylä-Herttuala, S. (1999). Oxidized LDL and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *874*, 134–137. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09231.x>
- Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *44*, 03–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>

8. Apéndices

8 Apéndices

8.1 Acta de Aprobación Ética – Artículo 1.



Universidad de los Andes
Santiago-Chile

Santiago de Chile, 19 de Julio de 2012

Señores

Concurso de Proyectos Fondecyt de Iniciación en Investigación 2012

Presente

Estimados Señores:

*El Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes ha revisado el Proyecto de Investigación titulado **“Characterization of lung oxidative stress and inflammation due to prolonged aerobic exercise, using non-invasive methods”** del que es investigador responsable el Dr. Oscar Araneda Valenzuela y que es presentado al Concurso de Proyectos Fondecyt de Iniciación en Investigación 2012.*

Este estudio busca caracterizar el estrés oxidativo e inflamación a nivel pulmonar en sujetos sometidos a ejercicio físico aeróbico prolongado de distintas intensidades y duración por medio de la recolección de muestras no invasivas de esputo y condensación de aire espirado y de plasma. Para lo anterior se llevará a cabo un estudio cuantitativo experimental en 2 grupos de 15 sujetos cada uno que serán sometidos a diversas pruebas y posterior recolección de las muestras antes enunciadas.

Se trata de un estudio bien diseñado con una metodología consistente con los objetivos planteados. El cálculo del tamaño muestral a estudiar está justificado. El investigador principal ha realizado proyectos previos relacionados que avalan su competencia.

El consentimiento informado es adecuado, se especifican los objetivos del estudio, la confidencialidad del manejo de la información, además de especificar la manera de ubicar al investigador responsable en caso de ser necesario.

Tomando en cuenta lo anteriormente enunciado, el Comité de Ética no presenta reparos en la realización de este proyecto.

Sin otro particular, saludan atentamente



*Dr. Alejandro Serani Merlo
Presidente*



*Dra. Colomba Cofré Dougnac
Secretaria Académica*



8.2 Acta de Aprobación Ética – Artículo 2.

 <p>PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE</p>	<p>ACTA DE APROBACIÓN NUEVO ESTUDIO COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO CEC MED-UC Re-acreditado por SEREMI de Salud <u>Resolución Exenta N°012321 del 07 de junio de 2017</u></p> <p>Fecha y N° de Sesión: 20 de junio de 2019, Sesión N° 10.</p> <p>Investigador responsable: FELIPE CONTRERAS BRICEÑO ID Protocolo: 180921007</p> <p>Título del Proyecto: Influencia de la humedad relativa sobre los cambios inducidos por ejercicio físico en el estado óxido-reducción del sistema respiratorio</p> <p>Facultad/Unidad Académica: Departamento de Ciencias de la Salud- Campus San Joaquín Sitio de realización: Laboratorio de Fisiología del Ejercicio, Edificio Ciencias de la Salud, Campus San Joaquín Financiamiento: No requiere financiamiento</p> <p>Miembros del Comité que participaron en la aprobación del estudio: Dra. Colomba Cofré Dognac, Presidente (S) Mg. Andrea Villagrán Torres, Secretaria Ejecutiva Sr. Jorge Muñoz Castillo, Abogado miembro externo Dra. Katia Abarca Villaseca, Departamento Infectología Dr. Gastón Chamorro Spikin, Departamento de Enfermedades Cardiovasculares EU Rina González Rodríguez, Escuela de Enfermería Dr. César Sánchez Rojel, Departamento de Hemato-Oncología Srta. Alyssa Garay Navea, Representante de la comunidad</p> <p>Documentos recibidos por el comité:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Carta Presentación Investigador Responsable - Carta Apoyo Jefe de Departamento de Ciencias de la Salud, Dr. Arnoldo Riquelme Pérez <p>Documentos revisados y aprobados por el comité:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Formulario Solicitud Revisión Ética - Documento de Consentimiento Informado Grupo Experimental, versión 2.0 29 / 05 / 2019 - Marco Teórico y Metodología, versión 29 / 05 / 2019 <p>Considerando: 1- Que los investigadores referidos cuentan con la experiencia necesaria para el desarrollo de este tipo de estudio,</p>
---	--



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

- 2- Que la metodología descrita es apropiada para cumplimiento de los objetivos del estudio, siguiendo los estándares internacionales para ello,
- 3.- Que durante el desarrollo del estudio se garantiza un balance beneficio/riesgo apropiado para los participantes,
- 4.- Que la población a estudiar no es considerada como vulnerable y el protocolo contempla todos los resguardos necesarios para la seguridad y bienestar de los participantes.
- 5- Que se resguarda la confidencialidad de los datos registrados de los participantes en la difusión de resultados por lo que, no introduce un riesgo de menoscabo de su intimidad.

Y verificado que en el documento de consentimiento informado mencionado se incluye:

- 1.- Una descripción general de los objetivos de la investigación,
- 2.- Detalle de los procedimientos que involucra la participación en este estudio,
- 3.- Antecedentes sobre el uso que se dará a la información obtenida por cada uno de los procedimientos de investigación a utilizar,
- 4.- Compromiso respecto al uso de la información que sólo se realizará dentro de los marcos de la presente investigación y para el logro de dichos objetivos,
- 5.- El aseguramiento de la confidencialidad y anonimato de los datos entregados dentro de los marcos propios de cada procedimiento del estudio,
- 6.- Antecedentes respecto del costo en tiempo que tiene la participación en el estudio,
- 7.- Información sobre los derechos ante riesgos y cobertura de daños por la participación en estudio,
- 8.- La voluntariedad de la participación y la garantía para cada participante de tener la opción hacer abandono del estudio.

Se resuelve respecto de este proyecto:

- 1.- Que están tomadas las precauciones necesarias para resguardar la seguridad de las personas y el tratamiento ético de la información entregada de quienes participen en la investigación,
- 2.- Y que los participantes lo harán voluntariamente luego de ser adecuadamente informados sobre los aspectos esenciales de la investigación, sus deberes y derechos, en los plazos necesarios para el éxito de la investigación.

Resolución CEC Med UC:

Este proyecto ha sido discutido y aprobado con fecha **20 de junio de 2019** en la sesión ordinaria N°10 del Comité y tiene vigencia de un año.



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

Se solicita, previo al reclutamiento de participantes, timbrar la última versión aprobada del documento de consentimiento informado y velar, como Investigador Responsable por la realización del proceso de consentimiento informado, utilizando las copias de la versión original (timbradas y firmadas por el CEC MedUC).

El investigador responsable deberá solicitar la renovación anual de la presente aprobación ética con al menos 45 días de anticipación si desea continuar con el estudio. Si no ha recibido la respuesta oficial a su solicitud, el investigador deberá detener las actividades del proyecto, y no podrá evaluar ni enrolar a ningún nuevo participante y no podrá realizar el análisis de los datos que identifiquen a los participantes.

En la eventualidad de querer incorporar modificaciones, por ejemplo, diseño o rediseño de instrumentos de recolección de datos, cambios en la muestra, el personal a cargo, los procedimientos especificados en el protocolo aprobado u otros, el investigador deberá notificarlo al comité a través de una enmienda para la evaluación y emisión de una nueva carta de aprobación ética.

Por favor lea cuidadosamente la hoja anexa a esta carta en la que se indican todas sus responsabilidades como investigador responsable de este estudio (ID: **180921007**)

Le saludan cordialmente,


SRA. ANDREA VILLAGRÁN TORRES
 Secretaria Ejecutiva CEC-MedUC



DRA. COLOMBA COFRÉ DOUGNAC
 Presidente (S) CEC-MedUC

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC Med UC

Se certifica que la información contenida en el presente documento es correcta y que refleja el acta del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina (CEC-Med UC). Este Comité adhiere a los principios éticos de Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica, que considera como norma fundamental el respeto a la dignidad de la persona humana en cualquier condición, desde el momento de la concepción hasta la muerte natural. Este Comité cumple además con las guías de buena práctica clínica definidas por la conferencia internacional de armonización (GCP-ICH); y con las leyes chilenas 20.120 y 19.628 sobre protección de la vida privada o protección de datos de carácter personal.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

8.3 Acta de Aprobación Ética – Artículo 3.



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

CERTIFICADO DE APROBACIÓN CEC MEDUC

SE APROBÓ EL SIGUIENTE PROYECTO

Número de Proyecto: 180305007

Título del proyecto: Confiabilidad de la medición de saturación de oxígeno de musculatura respiratoria en ejercicio físico

Investigador responsable: FELIPE ANDRES CONTRERAS BRICEÑO

Institución: Pontificia Universidad Católica de Chile

Académico responsable: FELIPE ANDRES CONTRERAS BRICEÑO

Institución: Pontificia Universidad Católica de Chile

Financiamiento: Fondos propios (indicar) Recursos propios

Estimado Investigador:

Comunicamos a usted que la documentación presentada para el estudio en referencia, ha sido aprobada con fecha **05 de Junio de 2018**. Solicitamos a usted acercarse a la oficina del CEC-MedUC, para retirar su acta de aprobación oficial y regularizar la documentación que corresponda.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Este documento es sólo un borrador, el acta de aprobación oficial firmada y timbrada debe ser retirada en la oficina del CEC-MedUC ubicada en Diagonal Paraguay #383, Torre 11, piso 1, Local 4, Santiago, de Lunes a Viernes de 09:00 a 13:30 horas.

Cualquier consulta puede contactarse con Patricia Moreno o Solange Santibáñez al mail cecmeduc@uc.cl o al teléfono +56223548173.-



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

CERTIFICADO DE APROBACIÓN CEC MEDUC

Muy cordialmente,

Andrea Villagrán

Coordinadora

Secretaria Ejecutiva

CEC-MedUC

Santiago, 07 de junio de 2018

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Este documento es sólo un borrador, el acta de aprobación oficial firmada y timbrada debe ser retirada en la oficina del CEC-MedUC ubicada en Diagonal Paraguay #383, Torre 11, piso 1, Local 4, Santiago, de Lunes a Viernes de 09:00 a 13:30 horas.

Cualquier consulta puede contactarse con Patricia Moreno o Solange Santibáñez al mail cecmeduc@uc.cl o al teléfono +56223548173.-

8.4 Presentación póster - 67th Annual Meeting, ACSM.

Swimming and respiratory system: impact of exercise on pro-oxidants production and lung function. (2020). Contreras-Briceño, F^{1,2}; Viscor, G² & Araneda, OF³. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 52 (7S): 393. DOI: 10.1249/01.mss.0000678104.76655.75

S310 Vol. 52 No. 5 Supplement		MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE®	
1495	Board #89 Leptin, Adiponectin And Exercise-Induced Bronchoconstriction In Non-asthmatic Children Louise A. Turner ¹ , Benjamin P. Green ² , Penny L.S. Rumbold ¹ . ¹ Sheffield Hallam University, Sheffield, United Kingdom. ² Nutricia Advanced Medical Nutrition, Trowbridge, United Kingdom. ³ Northumbria University, Newcastle-upon-Tyne, United Kingdom. (No relevant relationships reported)	May 28 10:30 AM - 12:00 PM	explosively chronically to exercise and respiratory irritants. More studies are necessary to identify and isolate the plausible factors involucreated in the formation of respiratory pro-oxidants during exercise in athletes chronically exposed to respiratory irritants.
	Purpose: Exercise-induced bronchoconstriction (EIB) has been associated with BMI in asthmatic children, while increased body fat contributes to a reduction in post-exercise pulmonary function in non-asthmatic children. Obesity related-adipocyte hormones such as leptin and adiponectin correlate with EIB severity in asthma however, the role of these hormones on EIB in non-asthmatic children remains unclear. The purpose of this study is to investigate the relationship between leptin and adiponectin and EIB in non-asthmatic children. Methods: Twenty-five non-asthmatic prepubescent children (9-10 yr) completed pulmonary function tests (FEV ₁ , FVC, FEF _{25-75%}) pre- and post-exercise. Each participant completed an incremental, cycle-ergometer exercise test to exhaustion (VO _{2max}). The maximum percentage fall in FEV ₁ and FEF _{25-75%} from pre- to post- exercise was calculated, participants were subsequently classified as EIB positive (EIB+) with drop in FEV ₁ ≥ 10%. The change in airway function from pre- to post exercise was assessed as the area under the curve of the percentage fall in post-exercise FEV ₁ and FEF _{25-75%} plotted against time for 15 min (AUC ₀₋₁₅), using trapezoidal integration. Serum leptin and adiponectin levels were determined from a fingertip capillary blood sample taken before exercise. Results: BMI was significantly correlated with leptin (r = 0.473, p<0.05), but not adiponectin in the overall group (n=25). There was also no significant correlation between leptin or adiponectin and any pulmonary function measure for the overall group. When participants were categorized as EIB+ or EIB-, there was a significant correlation between: leptin and %drop in FEV ₁ (r = -0.917, p < 0.05) and FEV ₁ AUC ₀₋₁₅ (r = -0.780, p < 0.05); and adiponectin and %drop in FEF _{25-75%} (r = -0.780, p < 0.05) and FEF _{25-75%} AUC ₀₋₁₅ (r = -0.803, p < 0.05) for the EIB+ group. In the EIB- group, there was no significant correlation between leptin or adiponectin and pulmonary function. Conclusion: There was a significant correlation between leptin and adiponectin and decreased airway function in EIB+, but not EIB- non-asthmatic children. The causality of this relationship warrants further investigation, but could provide insight into potential intervention strategies for the management of EIB.	May 28 10:30 AM - 12:00 PM	1497 Board #91 Abstract Withdrawn
1496	Board #90 Swimming And Respiratory System: Impact Of Exercise On Pro-oxidants Production And Lung Function Felipe Andrés Contreras Briceño ¹ , Ginés Viscor ² , Oscar Florencio Araneda ³ . ¹ Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. ² Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ³ Universidad de Los Andes, Santiago, Chile. Email: klgo.fcontreras@gmail.com (No relevant relationships reported)	May 28 10:30 AM - 12:00 PM	1498 Board #92 Inhaled Albuterol Increases Forced Mid-expiratory Flows In Non-asthmatic Children With And Without Obesity Daniel P. Wilhite ¹ , Dharini M. Bhammar ² , Ashley Peck ¹ , Marcus Payne ¹ , Tanya Martinez-Fernandez ¹ , Tony G. Babb, FACSM ¹ . ¹ Texas Health Presbyterian Hospital Dallas, Dallas, TX. ² University of Nevada - Las Vegas, Las Vegas, NV. ³ University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX. (Sponsor: Tony G. Babb, FACSM) Email: DanielWilhite@texashealth.org (No relevant relationships reported)
	Scientific Abstract (ACSM World Congress 2020) Swimming and Respiratory System: Impact of Exercise on Pro-oxidants Production and Lung Function. The respiratory redox state of swimmers can be affected by the increase of minute ventilation (VE) during exercise and/or by chronic exposure to chlorine used to sanitize the water of swimming pools. However, in indoor-pools, the high-humidity and warm-water temperature are recognized as respiratory protecting factors. The exhaled breath condensate (EBC) is a non-invasive method used to assess the pro-oxidants species (EBC) is a non-invasive method used to assess the pH and pro-oxidants species (nitrite [NO ₂], hydrogen peroxide [H ₂ O ₂]), while spirometry the lung function (FEV ₁ , FEV ₁ /FVC, FEF _{25-75%}). PURPOSE: To assess the impact of a high-intensity and prolonged-time exercise on the production of [H ₂ O ₂] _{EBC} , [NO ₂] _{EBC} , pH _{EBC} and lung function in swimmers. METHODS: Longitudinal quasi-experimental study. 18 competitive swimmers (8 female) (22±2 years; 53.1±3.5 mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹ VO _{2max}) completed 3.500-m of swim in indoor pool treated by chlorine (intensity of 80.2±3.1% of HR _{max}) with no exposure to respiratory irritants by 5-days previous to tests. The spirometry test and EBC collection were done at rest, 20-minutes and 24-hours post-exercise and were analyzed using one-way RM-ANOVA test by the GraphPad-Prism software (v.6.0). The p-values<0.05 was considered for differences. RESULTS: The [H ₂ O ₂] _{EBC} (0.23±0.15 vs 0.28±0.12 vs 0.20±0.10 (umol·L ⁻¹)) and [NO ₂] _{EBC} (1.79±0.21 vs 1.37±0.15 vs 1.03±0.16 (umol·L ⁻¹)) decreased significantly at 24-hr post-exercise. The pH _{EBC} (p=0.23 and 0.32) and FEV ₁ , FEV ₁ /FVC, FEF _{25-75%} do not changed significantly between stages. CONCLUSION: A acute high-intensity and prolonged-time swimming session decreased the pro-oxidants production with no changes in lung function in swimmers	May 28 10:30 AM - 12:00 PM	1499 Board #93 Influence Of Body Fat On Pulmonary Function And Exercise Capacity In Heart Failure Patients Joshua R. Smith, Nico Villarraga, Jessica D. Berg, Katlyn E. Koepp, Thomas P. Olson, FACSM. <i>Mayo Clinic, Rochester, MN.</i> (Sponsor: Thomas Olson, FACSM) Email: smith.joshual@mayo.edu (No relevant relationships reported)

THURSDAY, MAY 28, 2020

8.5 Presentación oral - 25th Annual Meeting, ECSS.

The high humidity gives bronchodilation and not increase respiratory pro-oxidants induced by exercise. (2020). **Contreras-Briceño, F**^{1, 2}; Espinosa-Ramírez, M¹; Viscor, G² & Araneda, OF³. European Journal of Sport Science



25th Annual Congress of the
EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE
SPORT SCIENCE IN THE HEART OF ARTS
 1 to 3 July 2020, Sevilla - Spain
Hosted by Universidad Pablo de Olavide



EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE

Aachener Str. 1053 -1055
 50858 Cologne
 GERMANY

VAT-ID: DE251715668 - St.Nr.: 223/5905/0216
 register of associations: VR12508

Sevilla, 10.03.2020 - 20:37:34

Letter of Acceptance

This is to certify that the following title has been accepted at the 25th Annual Congress of the European College of Sport Science between 1 - 3 July 2020 in Sevilla, Spain:

FELIPE ANDRÉS CONTRERAS BRICEÑO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
 AV. VICUÑA MACKENNA 4860
 7820436 SANTIAGO, Chile

Abstr.-ID: 1738
 Title: The high humidity gives bronchodilation and not increase respiratory pro-oxidants induced by exercise
 Authors: **Contreras-Briceño, F.**, Espinosa-Ramírez, M., Viscor, G., Araneda, O.F., Institution: Pontificia Universidad Católica de Chile
 Presentation format: Oral, YIA: No

Faculty of Sport Science, Universidad Pablo de Olavide

This document has been created digitally and is valid without a signature

TITLE

The high humidity gives bronchodilation and not increase respiratory pro-oxidants induced by exercise

Author(s):

Contreras-Briceño, F^{1,2}; Espinosa-Ramirez, M²; Viscor, G¹ & Araneda, OF³

Affiliations:

¹ *Physiology Section, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.*

² *Laboratory of Exercise Physiology, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.*

³ *Laboratory of Integrative Physiology of Biomechanics and Physiology of Effort (LIBFE), Kinesiology School, Faculty of Medicine, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.*

INTRODUCTION:

The lung function and redox state of the respiratory system can be altered by exercise, mainly due to increased lung ventilation and low environmental temperature (1). Under these conditions and as a consequence of increased respiratory flow, the organism is inefficient at saturating with water vapour and tempering inhaled air, which leads to dehydration of the respiratory epithelium and the release of local inflammatory factors mediated by pro-oxidants, generating bronchoconstriction (2). The spirometry and exhaled breath condensate (EBC) are non-invasive methods using for evaluating this phenomenon (3). This study evaluated, in recreational cyclists, the influence of high relative-humidity (90%-RH) on the production of respiratory pro-oxidants induced by physical exercise, measured by EBC, and changes in lung function evaluated by spirometry.

METHODS:

Sixteen participants (4 female) with no history of asthma or respiratory infection completed a previous cardiopulmonary exercise test (VO₂-peak test) for obtaining the maximum load (watts) of pedalling. Test consisted in 1-hour cycling at 70% of the

individual workload achieved in the VO₂-peak test (70-90 rpm cadence), in a semi-hermetic chamber constructed specially to keep the 90%-RH (± 24 °C). The temperature (forehead, mouth, and ambient), and symptoms (dyspnea and leg fatigue) were registered every 5 minutes during the protocol. The spirometry was measured before (rest) and 20 (20-post), and 80 (80-post) minutes after end, while samples of EBC (hydroperoxide [H₂O₂]_{EBC}, nitrite [NO₂⁻]_{EBC}) and plasma ([NO₂⁻]_P) were obtained rest and 80-post. The normality of the data was evaluated using the Shapiro-Wilk test. The variation in the temperature values, EBC and plasma pro-oxidants, and spirometry values (FEV₁ and FEV₁/FVC) were analysed using one-way RM-ANOVA. The statistical software used was GraphPad Prism 8.0. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS:

The cycling exercise was performed at high-intensity (86.0 ± 7.3 %HR_{máx} (220-age), 166 ± 26 watts). Forehead (36.2 ± 0.3 °C, $p = 0.230$), mouth (35.7 ± 0.1 °C, $p = 0.184$), and environmental (24.0 ± 0.1 , $p = 0.325$) temperatures and relative-humidity (90.6 ± 0.6 %-RH) were stable during the exercise protocol. FEV₁ and FEV₁/FVC increased at 20-post and 80-post (4.10 vs 4.24 ($p = 0.047$) and vs 4.25 ($p = 0.001$)) and (82.8 vs 86.9 ($p = 0.009$) and vs 85.9 ($p = 0.037$)), respectively. Non-significant increases were found in [H₂O₂]_{EBC} (0.22 to 0.24 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($p = 0.052$)), [NO₂⁻]_{EBC} (1.54 to 1.71 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($p = 0.198$)), and [NO₂⁻]_{EBC}/[NO₂⁻]_P (0.145 to 0.150 ($p = 0.447$)).

CONCLUSION:

A high relative-humidity protects the airway of respiratory pro-oxidants induced by exercise and allows bronchodilation in recreational cyclists.

References:

1. *Oxid Med and Cel Long* 2016; 1-23.
2. *Brit J Sports Med* 2012; 46 (5):385-390.
3. *Eur Respir J* 2005; 26 (3):523-548.

8.6 Presentación póster - 25th Annual Meeting, ECSS.

Intercostal muscle oxygenation during a maximal incremental exercise in male and female: differences. (2020). Espinosa-Ramírez, M¹; Viscor, G²; Araneda, OF³; Araya, F¹; Riquelme, S¹; Rodríguez, G¹ & Contreras-Briceño, F^{1, 2}. European Journal of Sport Science.



25th Annual Congress of the
EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE
SPORT SCIENCE IN THE HEART OF ARTS
 1 to 3 July 2020, Sevilla - Spain
Hosted by Universidad Pablo de Olavide



EUROPEAN COLLEGE OF SPORT SCIENCE

Aachener Str. 1053 -1055
 50858 Cologne
 GERMANY

VAT-ID: DE251715668 - St.Nr.: 223/5905/0216
 register of associations: VR12508

Sevilla, 10.03.2020 - 21:00:13

Letter of Acceptance

This is to certify that the following title has been accepted at the 25th Annual Congress of the European College of Sport Science between 1 - 3 July 2020 in Sevilla, Spain:

Maximiliano Espinosa

Pontificia Universidad Católica de Chile
 Avenida Vicuña Mackenna
 9250000 Macul, Chile

Abstr.-ID: 2017

Title: Intercostal muscles oxygenation during a maximal incremental exercise in male and female: difference between groups

Authors: Espinosa-Ramírez, M., Viscor, G., Araneda, O.F., Araya, F., Moya, E., Riquelme, S., Rodríguez, G., **Contreras-Briceño, F.**, Institution: Pontificia Universidad Católica de Chile

Presentation format: E-poster, YIA: No

Faculty of Sport Science, Universidad Pablo de Olavide

TITLE

Intercostal muscles oxygenation during a maximal incremental exercise in male and female: difference

Author(s):

Espinosa-Ramirez, M²; Viscor, G¹; Araneda, OF³; Araya, F²; Riquelme, S²; Rodríguez, G² & Contreras-Briceño, F^{1,2}.

Affiliations:

¹ *Physiology Section, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.*

² *Laboratory of Exercise Physiology, Faculty of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.*

³ *Laboratory of Integrative Physiology of Biomechanics and Physiology of Effort (LIBFE), Kinesiology School, Faculty of Medicine, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.*

INTRODUCTION:

In similar exercise intensities, women have more breathing work (WOB) than men, due to anatomical differences and respiratory mechanics (1). This increases when the minute ventilation (VE) exceeding 75 liters per minute, where the WOB of women is greater than men (2). The WOB has recently been recorded by near-infrared spectroscopy (NIRS) that evaluates the level of oxygen muscle saturation (SmO₂) in the superficial respiratory muscles (intercostal muscles) (3). The main objective was to compare the behavior of the SmO_{2-m.intercostal} in different exercise phases between men and women, and the secondary objective was evaluated the association between ventilatory variables with SmO_{2-m.intercostal}.

METHODS:

Seventeen healthy subjects active physically (eight women) performed an exercise incremental protocol in cicloergometer (ViaSPRINT 1500, Ergoline Taunstein, Germany). We register ventilatory variables: minute ventilation (VE), respiratory rate (RR) and tidal volume (Vt) with the breath by breath method. Respiratory gases (Master

Screen, Jaeger, Germany) were measured continuously during the test. The SmO_2 was evaluated throughout the test with the Moxy monitor device, which was positioned in the seventh right intercostal space. The exercise protocol consisted of 1-min rest, exercise phase to 30 watts initial and progressive increase 15 watts per minute until obtaining detentions criteria. The subjects were keeping a 70 – 90 cadences. A one-way ANOVA and Dunett test were used to detect changes intragroup, and two-way ANOVA for measure repeat for intergroup comparison. Significant main effects were followed-up by Bonferroni post-hoc procedures. Significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS:

Respect to SmO_2 -*m.intercostal* muscles behavior, both groups there is a significant difference in rest to VO_2 -peak phase $p < 0.0001$ and $p = 0.0098$, however only women have significant differences between rest and VT2 ($p = 0.0001$). In the associations, the VE was associated with the SmO_2 -*m.intercostal* in women ($r = 0.69$, $p = 0.05$) and with SmO_2 -*m.intercostal* in men ($r = 0.89$, $p = 0.00013$). The RR only was associated with SmO_2 -*m.intercostal* in women ($r = 0.72$, $p = 0.04$) and Vt only was associated with SmO_2 -*m.intercostal* in men ($r = 0.88$, $p = 0.001$).

CONCLUSION:

We conclude that men and women significantly decrease to SmO_2 -*m.intercostal* at the maximum intensity of exercise, however both had different behavior. Women were associated with RR and men were associated with Vt. In future research, we propose to evaluate the impact of respiratory muscle training on the SmO_2 -*m.intercostal*.

References:

1. *J Physiol.* 2007, 581,1309-1322.
2. *J Physiol.* 2015, 593,1975-1979.
3. *J Sports Sci.* 2019,37,2653-2659.

8.7 Otras publicaciones.

8.7.1 Artículo aceptado y publicado realizado durante el proceso del doctorado.

Kinesiología 2019;38(1):1-7

Contreras-Briceño y cols

Artículo Original

Evaluación del trabajo respiratorio mediante oxigenación muscular.

Felipe Contreras-Briceño¹, Antonio López Fuenzalida, Patricio García Valdes, Gregory Villarroel Silva¹, Cynthia Rojas Muñoz¹, Magdalena Chamorro Gine¹, Maximiliano Espinosa Ramírez¹.

RESUMEN

El aumento del trabajo respiratorio (*work of breathing*, WOB) es uno de los problemas kinesiológicos frecuentes en el quehacer clínico. Un desafío profesional es contar con valores de variables fisiológicas que permitan objetivar el WOB facilitando así su interpretación entre los diferentes profesionales de la salud. El uso de dispositivos portátiles que registran la longitud de onda cercana al rango infrarrojo (680-820 nm, *Near Infrared Spectroscopy* (NIRS)) en músculos superficiales permite obtener valores de hemoglobina total unida a oxígeno (tHb) y oxigenación muscular local (SmO₂), variables relacionadas al trabajo muscular pues reportan el flujo sanguíneo en la microcirculación y consumo de oxígeno local, respectivamente. Estos dispositivos situados en musculatura intercostal nos informan el WOB asociado a la respiración. Para evaluar esto, se analizó el comportamiento de tHb y SmO₂ en m.intercostal en 20 corredores de maratón durante la valoración de consumo de oxígeno máximo (VO₂-max), instancia que implica aumento sostenido e incremental de la ventilación pulmonar (VE), y por tanto de la actividad muscular respiratoria. El aumento de VE en 128,4 L·min⁻¹ ($\Delta\dot{V}E$ (máximo-reposo)) implicó una disminución en SmO₂-m.intercostal del 34% (ΔSmO_2 (reposo-máximo)), sin cambios en tHb (p=0,805). La VE tuvo una correlación inversa con SmO₂-m.intercostal (rho=-0.565; p=0,001). Se concluye que la valoración de SmO₂-m.intercostal es una forma novedosa de objetivar el WOB en sujetos sanos. Conocer la aplicabilidad clínica requiere de otros estudios que evalúen esta herramienta en pacientes con disfunciones cardiorrespiratorias, lo que permitiría incorporar su uso en nuestro desarrollo clínico profesional.

Palabras claves: Oxigenación muscular; Respiración; Trabajo respiratorio.

¹ Laboratorio de Fisiología del Ejercicio, Departamento Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile

Autor Correspondiente:

Felipe Contreras Briceño
Laboratorio de Fisiología del Ejercicio, Departamento Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.
Dirección: Avenida Vicuña Mackenna #4860, Campus San Joaquín, Edificio Ciencias de la Salud, Macul, Santiago, Región Metropolitana, Chile.
Contacto: fcontrerasb@uc.cl

Recibido: 04 de agosto de 2018

Aceptado: 26 de diciembre de 2018

ABSTRACT

The work of breathing (WOB) increased is a common kinesiological problems at the clinical practice. A professional challenge is to have values of physiological variables that allows to objective the WOB, thus facilitating its interpretation among different health professionals. The use of portable devices that measure by spectroscopy the near-infrared wavelength (680-820 nm) at superficial muscles allows to obtain values of total hemoglobin linked to oxygen (tHb) and local muscle oxygenation (SmO₂), variables related to muscle work because give information of the blood flow at the microcirculation and local oxygen consumption, respectively. These devices located at the m.intercostal could give information about the WOB associated to breathing. To evaluate this, the tHb and SmO₂ of the m.intercostal in 20 marathon runners were analyzed while they doing the maximum oxygen consumption test (VO₂-max), an exercise that increase the pulmonary ventilation and the respiratory muscle activity.

The increase of V E (128,4 L·min⁻¹($\Delta\dot{V}E$ (max-rest))) implied a decrease in SmO₂-m.intercostal (34% (ΔSmO_2 (max-rest))), without changes in tHb (p=0.805). The $\dot{V}E$ showed an negative correlation to SmO₂-m.intercostal (rho= -0.565; p=0.001).

It is concluded that the assessment of SmO₂-m.intercostal is a novel way to measure the WOB in healthy subjects. Their clinical applicability requires more studies that applied this tool in patients with cardiorespiratory dysfunctions, facilitating their incorporation in the professional clinical practice.

Keywords: Muscle oxygenation; Respiration; Work of breathing.

INTRODUCCIÓN

El trabajo de la musculatura respiratoria (*work of breathing*, WOB) corresponde a la energía necesaria para vencer las fuerzas elásticas y de resistencia que se oponen a la insuflación pulmonar (1). En la práctica habitual, el aumento del WOB se asocia al incremento en la ventilación pulmonar ($\dot{V}E$), aspecto condicionado al aumento de frecuencia respiratoria (FR) y/o volumen corriente (Vc) (2). En sujetos sanos el aumento de V E ocurre principalmente en el ejercicio físico (ej. prueba de consumo de oxígeno máximo (VO₂-máx)), mientras que en pacientes con disfunciones cardiorrespiratorias puede estar en condición de reposo y/o exacerbación (3)(4), repercutiendo en un problema kinesiológico que prioriza nuestros objetivos de tratamiento durante la practica clínica.

A pesar de que el WOB es un problema común en el área cardiorrespiratoria, su evaluación diaria se basa en hallazgos clínicos que le confieren subjetividad a su valoración dificultando así la interpretación entre los profesionales de la salud, aspecto que motiva la necesidad de contar con nuevas herramientas que nos permitan objetivar nuestras evaluaciones clínicas.

El avance tecnológico en el área de la fisiología ha permitido el desarrollo de instrumentos de fácil interpretación y aplicabilidad clínica. La reciente aparición de dispositivos no invasivos y portátiles que evalúan los cambios en la hemoglobina total (tHb) y niveles de oxígeno muscular local (SmO₂) mediante la espectroscopia de longitudes de ondas con frecuencias cercanas a la luz infrarroja (*Near Infrared Spectroscopy*, NIRS) aparecen como una alternativa válida para objetivar el WOB (5-8). Esta comunicación reporta la aplicabilidad del uso de NIRS en musculatura

intercostal para medir cambios en tHb y SmO₂ durante la prueba de ejercicio físico máximo (VO₂-máx) en corredores de maratón.

MÉTODOS

Se evaluaron 20 corredores de maratón (edad \pm D.E = 22 \pm 2) sin enfermedades ni antecedentes médicos relevantes. Todos fueron informados verbalmente y por escrito acerca de la investigación antes de obtener la firma del consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en seres humanos de la Pontificia Universidad Católica de Chile, siguiendo principios éticos de la Declaración de Helsinki.

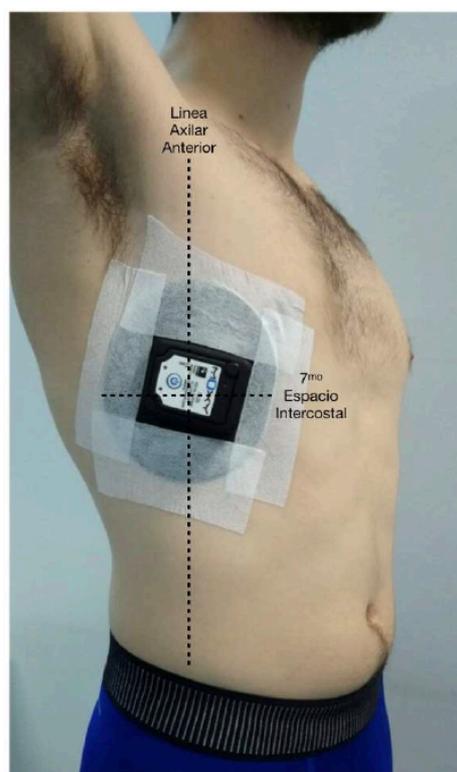


Figura 1. Ubicación de dispositivo de evaluación de oxigenación muscular en musculatura respiratoria (m.intercostal).

La medición de tHb y SmO₂ de musculatura intercostal fue obtenida a través de NIRS mediante el dispositivo MOXY® (Fortiori Design LLC, Minnesota, EE.UU), el cual reporta la cantidad de hemoglobina total (tHb) y oxigenación muscular tisular hasta una profundidad máxima de 15 mm (7). El dispositivo se ubicó en el séptimo espacio intercostal del hemitórax derecho en línea axilar anterior (Figura 1), siguiendo el protocolo propuesto en el estudio de Vogiatzis, et al. (9–11).

La prueba de VO₂-máx (MasterScreen CPX, Jaeger™, Alemania) se realizó en cinta rodante (HP Cosmos, Traunstein, Alemania) y tuvo las fases: calentamiento (5

Kinesiología 2019;38(1);1-7

Contreras-Briceño y cols

min · 8 km · hr⁻¹); ascenso (2 km · hr⁻¹ cada 2 minutos; hasta criterios de VO₂-máx); vuelta a la situación inicial (3 min · 6 km · hr⁻¹).

RESULTADOS

La figura 2a muestra los valores de hemoglobina total (tHb), oxigenación muscular (SmO₂), y figura 2b la ventilación pulmonar ($\dot{V}E$) durante la prueba de VO₂-máx en diferentes tiempos: reposo, umbral ventilatorio 1 (VT1), umbral ventilatorio 2 (VT2) y máximo. La tHb (mg · dL⁻¹) no cambió significativamente en los diferentes tiempos (Reposo=13,12; VT1=13,08; VT2=13,04; Máximo=13,00) (*p*-value > 0,05).

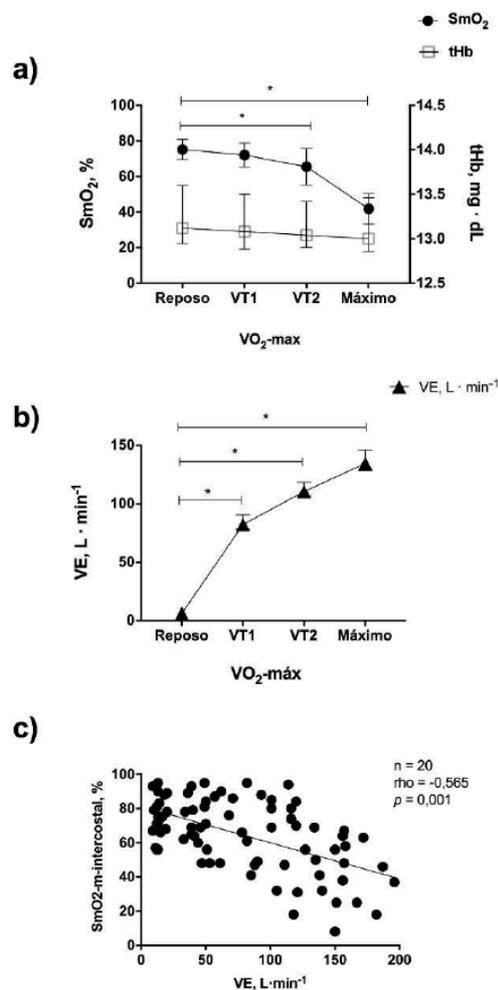


Figura 2. Comportamiento de variables en la prueba de consumo de oxígeno (n = 20). a) Oxigenación muscular (SmO₂) y hemoglobina total (tHb) en musculatura intercostal. b) Ventilación pulmonar (VE y SmO₂-m.intercostal). c) Correlación entre VE y SmO₂-m.intercostal.

Kinesiología 2019;38(1);1-7

Contreras-Briceño y cols

En comparación al valor en reposo, la SmO_2 (%) disminuyó significativamente en los tiempos VT2 y máximo (Reposo=75%; VT1=72% (ΔSmO_2 (Reposo-VT1= 3%); VT2=65% (ΔSmO_2 (Reposo-VT2= 15%); Máximo=41% (ΔSmO_2 (Reposo-Máximo = 34%); La ventilación pulmonar ($\dot{V}E$ (L·min⁻¹)) aumentó de forma progresiva y significativa en los diferentes tiempos (Reposo=6,2 L·min⁻¹; VT1=82,3 L·min⁻¹; VT2=110,5 L·min⁻¹; Máximo=134,6 L·min⁻¹). La figura 2c muestra la correlación inversa ($\rho = -0,565$; $p=0,001$) entre $\dot{V}E$ y SmO_2 -m.intercostal, con lo que se puede inferir que mayor WOB implica menor SmO_2 -m.intercostal.

DISCUSIÓN

Esta comunicación presenta la evaluación objetiva no invasiva de los cambios en la tHb y SmO_2 de la m.intercostal durante una prueba de ejercicio físico máximo (VO_2 -máx) en 20 corredores de maratón. Uno de los hallazgos más importantes de este estudio fue que durante la prueba de VO_2 -máx la $\dot{V}E$ aumentó en 128,4 L·min⁻¹ ($\Delta \dot{V}E$ (máximo-reposo)) lo que se asoció a una disminución en SmO_2 -m.intercostal del 34% (ΔSmO_2 (reposo-máximo)), sin cambios en tHb ($p=0,805$). Además, ambas variables tuvieron una correlación inversa de -0,565 (ver figura 2c), lo que informa que a mayor $\dot{V}E$ existe menor SmO_2 -m.intercostal, hallazgo que sustenta lo encontrado en la literatura y evidencia el impacto del aumento del WOB sobre la SmO_2 -m.intercostal (12-14). Sin embargo, al evaluar la prueba en distintos tiempos se demuestra que el aumento incremental de la $\dot{V}E$ tiene un mayor impacto sobre la SmO_2 -m.intercostal en los tiempos VT2 (ΔSmO_2 (Reposo-VT2= 15%) y Máximo (ΔSmO_2 (Reposo-Máximo = 34%), complementando así lo expuesto por Vogiatzis, et al. (12), quienes evaluaron la SmO_2 -m.intercostal en 6 marinos durante pruebas de senderismo y bicicleta a intensidad constante en series de 3 minutos, no encontrando cambios significativos en la tHb ni en SmO_2 ; de esto se puede inferir que el aumento del WOB disminuye la SmO_2 -m.intercostal en condiciones de ejercicio sólo a intensidad elevada, posterior al VT2, no tan notoriamente a intensidades menores. Estos hallazgos encontrados en sujetos sanos motivan el interés en evaluar la aplicabilidad de la tecnología NIRS en pacientes con patologías cardiorrespiratorias, donde el aumento del WOB puede estar presente en episodios de exacerbación o incluso en condiciones de reposo, por lo que la evaluación mediante NIRS parece una alternativa útil para evaluar el WOB en estos tipo de pacientes (12-17).

Esta comunicación es la base para que en futuros estudios se evalúe el impacto de las intervenciones kinesiológicas sobre la oxigenación muscular respiratoria y/o periférica, aspecto relevante para incorporar en los programas de rehabilitación física, sobretudo en población donde la frecuencia cardiaca, dado la farmacología usada para mantener en control la enfermedad, deja de ser una variable adecuada para prescribir la intensidad de ejercicio físico.

CONCLUSIÓN

En conclusión, el uso de la tecnología NIRS en distintos escenarios de la practica kinesiológica parece ser un método útil y válido para objetivar WOB en sujetos sanos. Es necesario seguir explorando esta temática y dar a conocer su

Kinesiología 2019;38(1);1-7

Contreras-Briceño y cols

aplicabilidad en el ámbito clínico, ampliando así la posibilidad de informar a la comunidad científica el impacto de nuestras terapias sobre la SmO_2 .

AGRADECIMIENTOS

A Miguel Carrasco, Francisco Cerda, Diego Henríquez, Gonzalo Hevia, personal técnico del Laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores de este artículo declaran no tener conflicto de interés

BIBLIOGRAFÍA

1. Gunter JB. Work of breathing. *Anesthesia & Analgesia*. 1997;84(3):702-3.
2. Bellani G, Pesenti A. Assessing effort and work of breathing. *Current Opinion in Critical Care*. 2014;20(3):352-8.
3. American Thoracic Society. Dyspnea. Mechanisms, assessment, and management: a consensus statement. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;159(1):321-40.
4. Parshall MB, Schwartzstein RM, Adams L, Banzett RB, Manning HL, Bourbeau J, et al. An Official American Thoracic Society Statement: Update on the Mechanisms, Assessment, and Management of Dyspnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012;185(4):435-52.
5. Eiken O, Bjurstedt H. Dynamic exercise in man as influenced by experimental restriction of blood flow in the working muscles. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1987;131(3):339-45.
6. Kaur J, Machado TM, Alvarez A, Krishnan AC, Hanna HW, Altamimi YH, et al. Muscle metaboreflex activation during dynamic exercise vasoconstricts ischemic active skeletal muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015;309(12):H2145-51.
7. McNulty CL, Moody WE, Wagenmakers AJM, Fisher JP. Effect of muscle metaboreflex activation on central hemodynamics and cardiac function in humans. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. 2014;39(8):861-70.
8. Thiel C, Vogt L, Himmelreich H, Hübscher M, Banzer W. Reproducibility of muscle oxygen saturation. *International Journal of Sports Medicine*. 2010;32(4):277-80.
9. Perrey S, Ferrari M. Muscle Oximetry in Sports Science: A Systematic Review. *Sport Medicine*. 2018;48(3):597-616.
10. Crum EM, O'Connor WJ, Van Loo L, Valckx M, Stannard SR. Validity and reliability of the Moxy oxygen monitor during incremental cycling exercise. *European Journal Sport Science*. 2017;17(8):1037-43.
11. Ferrari M, Muthalib M, Quaresima V. The use of near-infrared spectroscopy in understanding skeletal muscle physiology: recent developments. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*. 2011;369(1955):4577-90.
12. Vogiatzis I, Andrianopoulos V, Louvaris Z, Cherouveim E, Spetsioti S, Vasilopoulou M, et al. Quadriceps muscle blood flow and oxygen availability during repetitive bouts of isometric exercise in simulated sailing. *Journal of Sports Science*. 2011;29(10):1041-9.
13. Vogiatzis I, Athanasopoulos D, Habazettl H, Aliverti A, Louvaris Z, Cherouveim E, et al. Intercostal muscle blood flow limitation during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;182(9):1105-13.
14. Vogiatzis I, Athanasopoulos D, Habazettl H, Kuebler WM, Wagner H, Roussos C, et al. Intercostal muscle blood flow limitation in athletes during maximal exercise. *The Journal of Physiology*. 2009;587(14):3665-77.
15. Jones S, Chiesa ST, Chaturvedi N, Hughes AD. Recent developments in near-infrared spectroscopy (NIRS) for the assessment of local skeletal muscle microvascular function and capacity to utilise oxygen. *Artery Research*. 2016;16:25-33.
16. Chen S, Li Y, Zheng Z, Luo Q, Chen R. The analysis of components that lead to increased work of breathing in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Journal of Thoracic Disease*. 2016;8(8):2212-8.
17. Adami A, Cao R, Porszasz J, Casaburi R, Rossiter HB. Reproducibility of NIRS assessment of muscle oxidative capacity in smokers with and without COPD. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2017;235:18-26.

8.7.2 Artículo aceptado y en prensa realizado durante el proceso de doctorado.

Sociedad Chilena de Medicina del Deporte (SOCHMEDEP) (Septiembre 2020)

REPORTE DE CASO**Oxigenación en músculos respiratorios y locomotores durante el ejercicio máximo en dos corredores de maratón.****Oxygenation of respiratory and locomotor muscles during maximal exercise in two marathon runners.**Felipe Contreras-Briceño. *MSc.*^{a,b}; Maximiliano Espinosa-Ramirez. *MSc.*^a; Francisco Cerda.^a; Miguel Carrasco.^a; Diego Henríquez.^a; Gonzalo Hevia.^a; Oscar Araneda. *PhD.*^c; Ginés Viscor. *PhD.*^b^aLaboratorio de Fisiología del Ejercicio, Departamento Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Avenida Vicuña Mackenna #4860, Macul, Santiago, Región Metropolitana, Chile.^bSección de Fisiología, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Avenida Diagonal #643, Barcelona, España.^cLaboratorio de Biomecánica y Fisiología del Esfuerzo, Carrera de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. Monseñor Álvaro del Portillo #12455, Las Condes, Santiago, Región Metropolitana, Chile.Autor para correspondencia: Sr. Felipe Andrés Contreras Briceño; Dirección: Avenida Vicuña Mackenna #4860, Campus San Joaquín, Edificio Ciencias de la Salud, Macul, Santiago, Región Metropolitana, Chile; Correo electrónico: fcontrerasb@uc.cl; Teléfono: +56 2 23541353

Enviado el 04 de mayo 2020 / Aceptado el 05 de septiembre 2020

Resumen:

Un elevado trabajo respiratorio (*work of breathing*, WOB) asociado a la hiperventilación pulmonar durante el ejercicio físico puede limitar el rendimiento deportivo en corredores de maratón. Evaluar los cambios del WOB durante el ejercicio físico máximo, como es la prueba de consumo de oxígeno ($\dot{V}O_{2\text{-máx}}$), permite conocer la intensidad de ejercicio a la cual el WOB limita la entrega de nutrientes y oxígeno en músculos periféricos implicados en la locomoción. La evaluación no invasiva de la saturación de oxígeno a nivel muscular (SmO_2) por medio de la interpretación de ondas cercanas al rango infrarrojo (*Near Infrared Spectroscopy*, NIRS) es un método novedoso y útil para cuantificar el trabajo

muscular, aplicable tanto en musculatura intercostal ($SmO_{2\text{-m.intercostales}}$) para el WOB, como en musculatura locomotora ($SmO_{2\text{-m.vastus laterallis}}$) para la carga periférica. Así, a medida que aumenta la intensidad del esfuerzo físico es esperable una mayor disminución en SmO_2 ; sin embargo, se desconoce como la estrategia ventilatoria usada para alcanzar la hiperventilación pulmonar afecta la SmO_2 de estos grupos musculares, cuyo trabajo muscular los afecta recíprocamente a través del reflejo metabólico. Como caso clínico, presentamos los cambios en $SmO_{2\text{-m.intercostales}}$ (WOB) y locomotora ($SmO_{2\text{-m.vastus laterallis}}$) durante la prueba de $\dot{V}O_{2\text{-máx}}$ en dos corredores competitivos de maratón de similares características

antropométricas, capacidad física, régimen de entrenamiento e historial deportivo. El objetivo es entregar nueva información que muestre cómo la estrategia ventilatoria adoptada durante el ejercicio puede limitar el trabajo muscular periférico realizado.

Palabras claves: *Ejercicio, Oxigenación muscular, Respiración, Trabajo respiratorio.*

Abstract:

A high work of breathing (WOB) associated with pulmonary hyperventilation during physical exercise, may limit sports performance in long-distance runners (e.g. marathon). The assessment of changes in WOB during maximal oxygen consumption test ($\dot{V}O_2$ -máx.) allows knowing the intensity of exercise at which the higher WOB limits the delivery of nutrients and oxygen in muscles involved during locomotion. The non-invasive assessment of muscle oxygenation (SmO_2) by the interpretation of wavelengths of near-infrared range (Near-Infrared Spectroscopy, NIRS) is a useful and new method to quantify muscle work, used at intercostal muscles (SmO_2 -m. intercostales) to the WOB, and at locomotor muscles (SmO_2 -m.vastus laterallis) to external load. Thus, as the intensity of exercise increases, a higher decrease in SmO_2 is showed. However, until now is unknown how the ventilatory strategy used to achieve pulmonary hyperventilation affects the SmO_2 of these muscle groups, whose muscle work affects them reciprocally through the metabolic reflex.

As a report-case, we present the changes in SmO_2 -m.intercostales (WOB) and peripheral (SmO_2 -m.vastus laterallis) during the $\dot{V}O_2$ -máx. test. in two competitive marathon runners with similar anthropometric characteristics, physical performance, training regimen and sports history. The

objective is to give new information for identifying that the ventilatory strategy used during exercise can affect the local oxygenation in muscles with high demand during exercise. To evaluate this aspect, helping to coach improving the exercise performance in their athletes.

Introducción

En pruebas físicas de larga distancia, corredores de maratón con mayor capacidad máxima de consumo de oxígeno ($\dot{V}O_2$ -máx) han mostrado mejor rendimiento deportivo (1)(2). Para alcanzar un elevado $\dot{V}O_2$ se requiere aumentar el flujo sanguíneo (Q) en músculos implicados en el gesto deportivo (ej. *m.vastus laterallis*, *m.tibialis anterior*, etc.), asegurando así la entrega de nutrientes y oxígeno, y depurando metabolitos provenientes de la contracción (3). Por otra parte, se requiere aumentar la ventilación pulmonar ($\dot{V}E$) con el objetivo de asegurar la hematosis sanguínea (4). Para esto, se requiere mayor acción de músculos respiratorios (ej. *m.intercostales*, *m.serratus anterior*, etc.), incrementando el trabajo o costo energético asociado a la respiración (*work of breathing*, WOB) desde un 3 al 5 % hasta 15% en deportistas (5) y 20-25% en no entrenados (6). Un mayor WOB conlleva la disminución del Q en músculos locomotores (reflejo metabólico), fenómeno implicado en la limitación del rendimiento deportivo (7).

El aumento en la $\dot{V}E$ se debe a una mayor frecuencia respiratoria (Fr) y/o volumen corriente (V_c) (8). La estrategia ventilatoria usada en el ejercicio varía dependiendo del sexo (9), la disciplina deportiva (10) y el modo de ejercicio (11), entre otros. Hasta el momento se desconoce el impacto que tienen las diferentes estrategias ventilatorias adoptadas durante el ejercicio sobre el WOB. Esto es relevante pues para optimizar el

rendimiento deportivo, los atletas deberían ser capaces de realizar la hiperventilación pulmonar usando aquella estrategia ventilatoria que implique el menor gasto energético o WOB, porque de esa manera no se limita la entrega de nutrientes y oxígeno en músculos locomotores, aspectos esenciales para mantener la actividad contráctil propia del gesto deportivo.

Una forma reciente de evaluar el trabajo muscular es cuantificando los cambios en la oxigenación local (SmO_2), utilizando la tecnología de espectroscopia de luz cercana al rango infrarrojo (*Near-Infrared Spectroscopy*, NIRS) (630-850 nm). Así, la evaluación de la SmO_2 en músculos intercostales (SmO_2 -*m.intercostales*) y locomotores (SmO_2 -*m.vastus laterallis*) permite la cuantificación del WOB y carga periférica, respectivamente. Nuestro grupo de investigación reportó recientemente la confiabilidad en la evaluación de la SmO_2 -*m.intercostales* y SmO_2 -*m.vastus laterallis* durante el ejercicio físico máximo e incremental, siendo *excelente* en ambos grupos musculares en altas intensidades de ejercicio, donde a su vez se alcanzan los mayores valores de VE y homogeneidad en las estrategias ventilatorias adoptadas en el ejercicio reflejado en los cambios de variables ventilatorias (Fr y Vc) (12).

Con el objetivo de mostrar cómo la estrategia ventilatoria adoptada durante el ejercicio afecta el trabajo muscular periférico realizado durante una prueba física incremental y máxima, se presenta este reporte de casos en donde se muestran los cambios de la SmO_2 -*m.intercostales*, como reflejo del WOB; SmO_2 -*m.vastus laterallis*, como reflejo de la carga periférica; y variables ventilatorias ($\dot{V}E$, Fr, Vc) en dos corredores de maratón con similares

características antropométricas (peso, talla, IMC) y rendimiento físico ($\dot{V}O_2$ -máx) durante la prueba de $\dot{V}O_2$ -máx.

Metodología

Sujetos

En este reporte de caso participaron dos corredores competitivos de maratón. **Deportista 1:** Varón (24 años, 60 kg, 174 cm) con volumen de entrenamiento habitual de 105 km semanales. Mejor tiempo en maratón de 2 horas, 30 minutos, 20 segundos. **Deportista 2:** Varón (24 años, 61 kg, 175 cm) con volumen de entrenamiento habitual de 102 km semanales. Mejor tiempo en maratón de 2 horas, 32 minutos, 15 segundos. Ambos deportistas firmaron el consentimiento informado antes de comenzar la evaluación, la cual se realizó en el Laboratorio de Fisiología del Ejercicio de la Pontificia Universidad Católica de Chile por personal especializado. Este proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Pontificia Universidad Católica de Chile (nº 180305007), considerando la Declaración de Helsinki referente a la experimentación en humanos estando en concordancia a estándares éticos sugeridos por Harris, Macsween y Atkinson (13).

Mediciones

Los participantes no realizaron actividad física en las 24 horas previas a la evaluación y se les instruyó suspender la ingesta alimentaria por al menos 3 horas previas. La medición consistió en una prueba de consumo de oxígeno máximo ($\dot{V}O_2$ -máx.) en condiciones controladas de Laboratorio (t° ambiental $22 \pm 2^{\circ}$ Celsius, humedad relativa $40 \pm 2\%$) en un ergómetro de cinta rodante (HP Cosmos™, Traunstein, Alemania) hasta el agotamiento voluntario. El protocolo consistió en 5 minutos a $8 \text{ km} \cdot \text{hr}^{-1}$ como fase de calentamiento, posterior aumento de 2

km·hr⁻¹ cada 150 segundos como fase central del ejercicio, hasta obtener criterios establecidos de detención de la prueba (14). La pendiente de la cinta rodante se mantuvo constante en 2%. Durante la evaluación, se registró la frecuencia cardíaca (FC), saturación de pulso (SpO₂), variables ventilatorias ($\dot{V}E$, Fr, Vc) y sensación subjetiva de esfuerzo. Los datos respiratorios se analizaron respiración por respiración utilizando espirometría de circuito abierto y se expresaron en condiciones STPD (MasterScreen CPX, Jaeger™, Alemania).

Saturación muscular de oxígeno (SmO₂)

El registro de la SmO₂ y hemoglobina total (THb) fue en forma simultánea en *m.intercostales* y *m.vastus laterallis* durante la prueba de $\dot{V}O_2$ -máx en cinta rodante,

utilizando dispositivos MOXY® (Moxy, Fortiori Design LLC, Minnesota, EE. UU) el que a través del principio de espectroscopía de luz cercana al rango infrarrojo (*Near-Infrared Spectroscopy*, NIRS) (630-850 nm) estima la proporción de hemoglobina y mioglobina unida o no a oxígeno en la microcirculación del territorio muscular. La posición de los dispositivos se basó en protocolo utilizado previamente por nuestro grupo de investigación (12). Así, en *m.intercostales* el dispositivo se ubicó en el séptimo espacio intercostal del hemitórax derecho en línea axilar anterior (**Figura 1a**); y en *m.vastus laterallis* se ubicó 4 cm externo-lateral al punto medio entre la espina iliaca antero superior y el borde superior de la patella (**Figura 1b**).

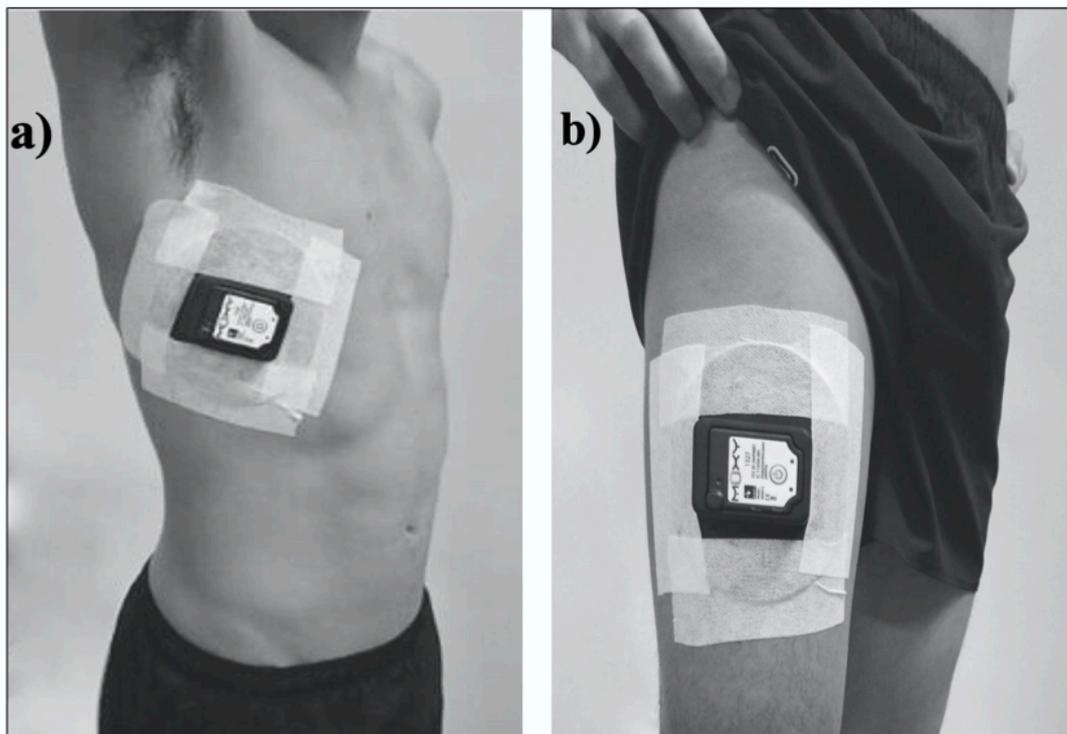


Figura 1. Ubicación de los dispositivos de medición de SmO₂.

Análisis de datos

Para la adecuada recolección de información, se sincronizó el inicio de registro de las variables obtenidas en el ergoespirómetro y la SmO₂. Así, se realizó un registro inicial de 90 segundos, seguido de 180 segundos correspondientes a la fase reposo. Para el análisis de datos se seleccionaron las fases umbral ventilatorio 1 (VT1) o umbral aeróbico, umbral ventilatorio 2 (VT2) o umbral anaeróbico o punto de compensación respiratoria, y valor máximo de $\dot{V}O_2$ -máx. La determinación de los umbrales se realizó mediante el método visual por dos evaluadores experimentados y ciegos a las mediciones.

El máximo valor alcanzado en la prueba se identificó como fase de $\dot{V}O_2$ -máx. considerado como el valor más alto de los últimos 30 segundos obtenidos durante la prueba incremental de esfuerzo máximo, considerando un índice válido de $\dot{V}O_2$ -máx. en sujetos que ejercen su límite de tolerancia al esfuerzo (15). Los valores de las variables de interés corresponden al promedio de los últimos 30 segundos de las fases: Reposo, VT1, VT2, y $\dot{V}O_2$ -máx. (16).

Los valores de SmO₂ presentan variabilidad entre grupos musculares principalmente porque en su análisis se incluye tanto la cuantificación de hemoglobina como

mioglobina (correspondiente alrededor del 30 a 50% de la señal), cuya concentración es variable dependiendo de las características morfológicas y estructurales de los diferentes grupos musculares, por lo que en la literatura científica no existen valores de normalidad como referencia. Con la finalidad de visualizar adecuadamente el comportamiento intra y entre grupos musculares evaluados en los deportistas, se realizó la estandarización de los valores obtenidos mediante el traspaso a unidades normalizadas o arbitrarias (SmO₂-*m.intercostales* (u.n) y SmO₂-*m.vastus laterallis* (u.n)), considerando el valor en etapa Reposo de cada grupo muscular como referencia y asignación de valor 1.0. Los cambios obtenidos en el resto de las etapas se expresan proporcionalmente respecto a la etapa Reposo. Con la finalidad de visualizar cómo la diferente estrategia ventilatoria usada por los deportistas afecta la oxigenación de los grupos musculares evaluados, se presenta los cambios de la relación o razón entre SmO₂-*m.intercostales* (u.n) / SmO₂-*m.vastus laterallis* (u.n) en las etapas respectivas.

Resultados

La **Tabla 1** muestra los valores de SmO₂ y THb en las fases Reposo, umbral ventilatorio 1 (VT1), 2 (VT2), y $\dot{V}O_2$ -máx.

Tabla 1. Valores de variables.

	Deportista 1	Deportista 2
$\dot{V}O_2$-máx		
Absoluto, (mL·min ⁻¹)	4278	4416
Relativo, (mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	71.3	72.4
<i>SmO₂-m. intercostales, %</i>		
Reposo	67	75
VT1	62	80
VT2	47	82
Máximo	37	45
Δ (Reposo-Máximo)	30	30
<i>SmO₂-m. intercostales, u.n</i>		
Reposo	1.00	1.00
VT1	0.92	1.06
VT2	0.70	1.09
Máximo	0.55	0.6
Δ (Reposo-Máximo)	0.45	0.40
<i>SmO₂-m. vastus laterallis, %</i>		
Reposo	60	63
VT1	42	45
VT2	20	26
Máximo	15	17
Δ (Reposo-Máximo)	45	46
<i>SmO₂-m. vastus laterallis, u.n</i>		
Reposo	1.00	1.00
VT1	0.70	0.71
VT2	0.33	0.41
Máximo	0.25	0.27
Δ (Reposo-Máximo)	0.75	0.73
$\dot{V}E$, L·min⁻¹		
Reposo	9	8
VT1	43	41
VT2	88	92
Máximo	166	168
Δ (Máximo-Reposo)	157	160
Vc, L		
Reposo	0,642	0,533

$\dot{V}O_2$ -máx: consumo de oxígeno máximo; SmO_2 : saturación muscular de oxígeno; $\dot{V}E$: ventilación pulmonar; Vc: volumen corriente; Fr: frecuencia respiratoria.

La **Figura 2** muestra los cambios absolutos de estas variables en la evaluación de $\dot{V}O_2$ -máx en los grupos musculares evaluados.

La **Figura 3** muestra los cambios estandarizados (u.n) en la evaluación de $\dot{V}O_2$ -máx en los grupos musculares evaluados (3a y 3b), y la relación entre ellos (3c).

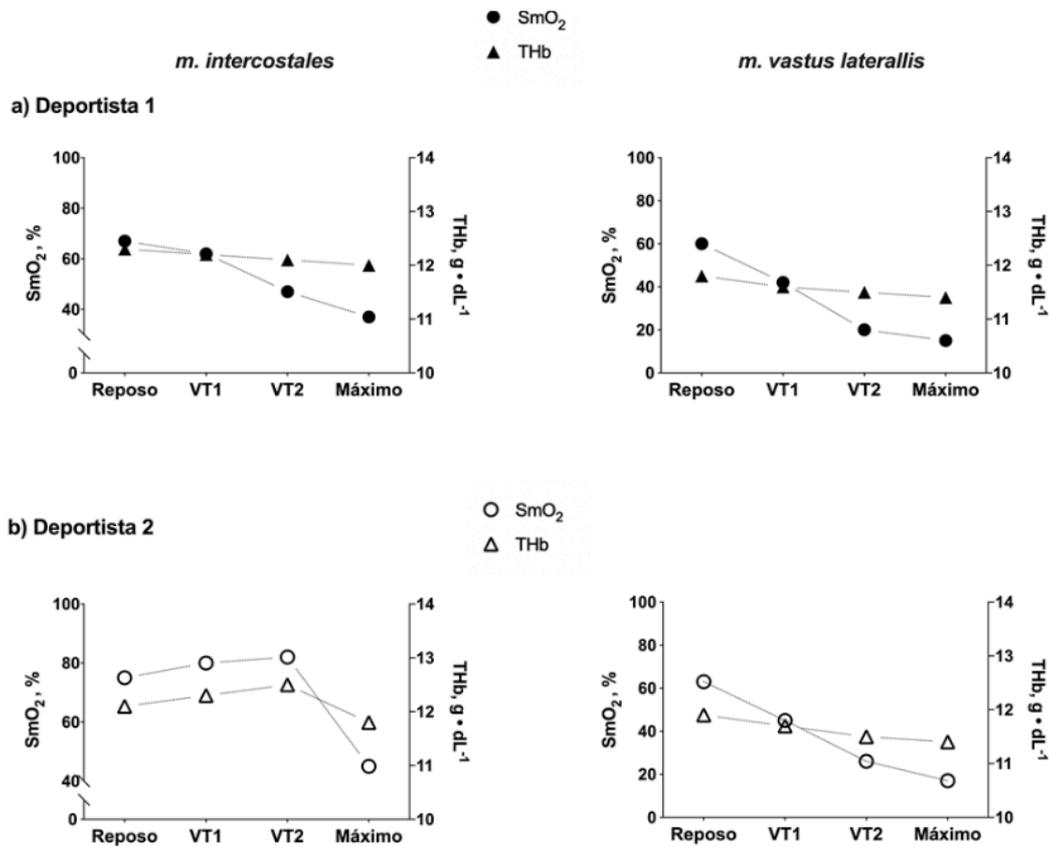


Figura 2. Valores absolutos de saturación muscular de oxígeno (%) y hemoglobina total ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) durante la valoración de consumo de oxígeno máximo en *m.intercostales* y *m.vastus laterallis*. a) Deportista 1. b) Deportista 2.

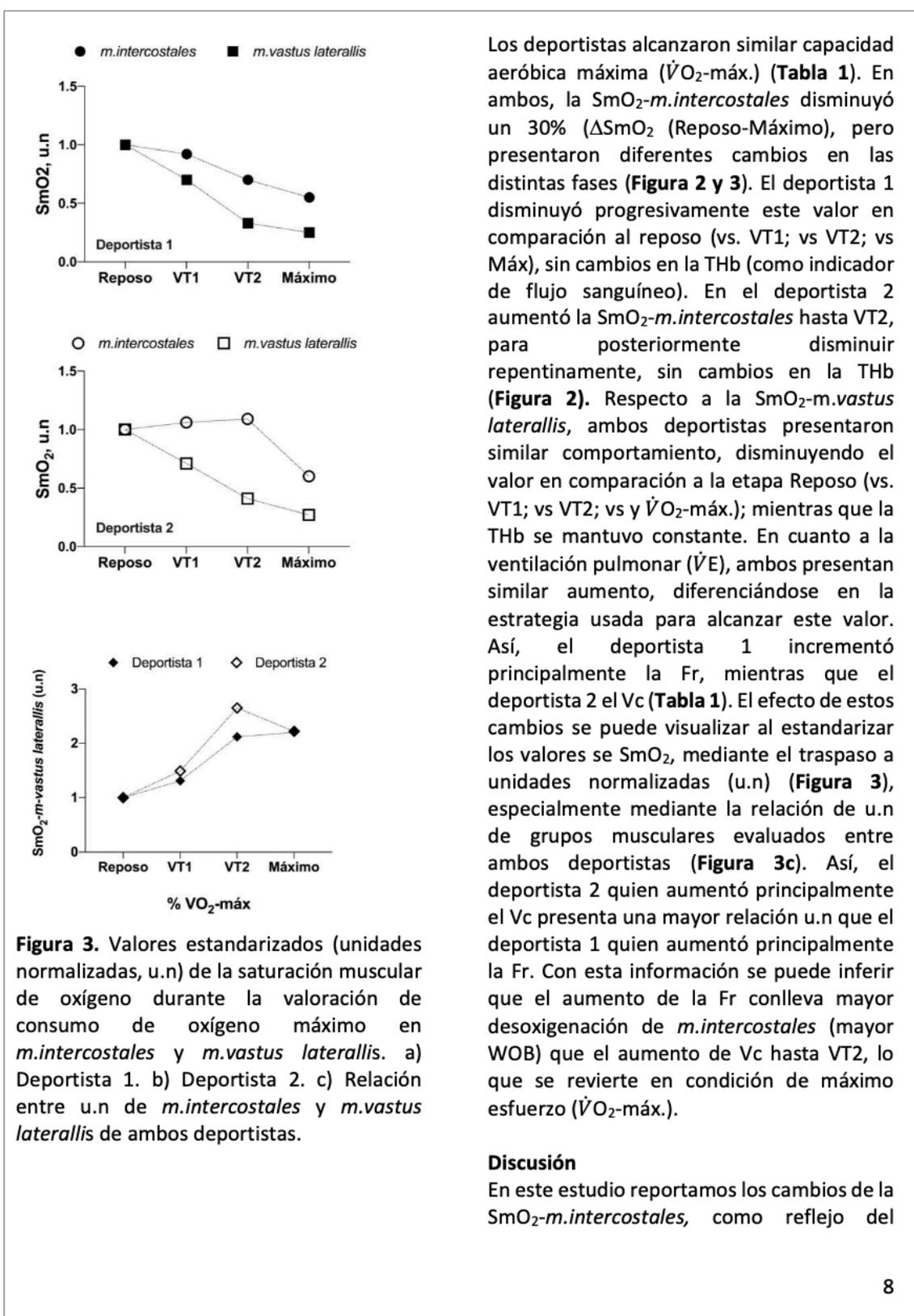


Figura 3. Valores estandarizados (unidades normalizadas, u.n) de la saturación muscular de oxígeno durante la valoración de consumo de oxígeno máximo en *m.intercostales* y *m.vastus laterallis*. a) Deportista 1. b) Deportista 2. c) Relación entre u.n de *m.intercostales* y *m.vastus laterallis* de ambos deportistas.

Los deportistas alcanzaron similar capacidad aeróbica máxima ($\dot{V}O_2$ -máx.) (Tabla 1). En ambos, la SmO_2 -*m.intercostales* disminuyó un 30% (ΔSmO_2 (Reposo-Máximo)), pero presentaron diferentes cambios en las distintas fases (Figura 2 y 3). El deportista 1 disminuyó progresivamente este valor en comparación al reposo (vs. VT1; vs VT2; vs Máx), sin cambios en la THb (como indicador de flujo sanguíneo). En el deportista 2 aumentó la SmO_2 -*m.intercostales* hasta VT2, para posteriormente disminuir repentinamente, sin cambios en la THb (Figura 2). Respecto a la SmO_2 -*m.vastus laterallis*, ambos deportistas presentaron similar comportamiento, disminuyendo el valor en comparación a la etapa Reposo (vs. VT1; vs VT2; vs y $\dot{V}O_2$ -máx.); mientras que la THb se mantuvo constante. En cuanto a la ventilación pulmonar ($\dot{V}E$), ambos presentan similar aumento, diferenciándose en la estrategia usada para alcanzar este valor. Así, el deportista 1 incrementó principalmente la Fr, mientras que el deportista 2 el Vc (Tabla 1). El efecto de estos cambios se puede visualizar al estandarizar los valores de SmO_2 , mediante el traspaso a unidades normalizadas (u.n) (Figura 3), especialmente mediante la relación de u.n de grupos musculares evaluados entre ambos deportistas (Figura 3c). Así, el deportista 2 quien aumentó principalmente el Vc presenta una mayor relación u.n que el deportista 1 quien aumentó principalmente la Fr. Con esta información se puede inferir que el aumento de la Fr conlleva mayor desoxigenación de *m.intercostales* (mayor WOB) que el aumento de Vc hasta VT2, lo que se revierte en condición de máximo esfuerzo ($\dot{V}O_2$ -máx.).

Discusión

En este estudio reportamos los cambios de la SmO_2 -*m.intercostales*, como reflejo del

WOB, y las variables ventilatorias ($\dot{V}E$, Fr, Vc) en dos corredores de maratón con similares características antropométricas (peso, talla, IMC) y rendimiento físico ($\dot{V}O_2$ -máx) durante la prueba de $\dot{V}O_2$ -máx. A su vez, reportamos la SmO_2 -*m.vastus laterallis* como reflejo del trabajo locomotor propio del gesto deportivo o carga periférica. Nuestro principal resultado es que en ambos deportistas disminuyó la SmO_2 -*m.intercostales* un 30% y la SmO_2 -*m.vastus laterallis* un 46% (ΔSmO_2 (Reposo-Máximo)). Al analizar las fases se observó que la SmO_2 -*m.intercostales* en el deportista 1 disminuyó durante toda la prueba, manteniendo la THb constante. En relación al deportista 2, la SmO_2 -*m.intercostales* aumentó hasta VT2 y posteriormente disminuyó abruptamente, manteniendo la THb sin cambios en las fases. La SmO_2 -*m.vastus laterallis* disminuyó progresivamente en ambos deportistas, sin cambios en la THb, lo que es proporcional a la mayor carga periférica durante la prueba de $\dot{V}O_2$ -máx.

Respecto a la oxigenación de musculatura respiratoria, los cambios registrados en el deportista 1 concuerdan con lo expuesto por Vogiatzis, *et al.* (17), quien reportó en diez ciclistas competitivos una disminución progresiva durante una prueba incremental. Lo anterior difiere a los resultados del deportista 2, donde posterior a VT2 recién comenzó a aparecer este fenómeno, coincidiendo con el aumento exponencial de la $\dot{V}E$. Lo interesante es que ambos mostraron diferentes estrategias ventilatorias durante la prueba, siendo este uno de los factores que puede tener un impacto en los cambios del WOB. En la literatura se ha reportado que la respuesta ventilatoria está condicionada inicialmente por el Vc hasta alcanzar el 50-60% de la capacidad vital, siendo una estrategia

eficiente y sólo limitada por la distensibilidad pulmonar (11). En intensidades mayores, el incremento de la $\dot{V}E$ se logra necesariamente por aumentos en la Fr, lo que tiene un mayor impacto en el WOB. El mayor costo energético asociado al aumento prematuro de la Fr, podría en un futuro asociarse a los mayores cambios en la SmO_2 -*m.intercostales*, que se reflejaría en un WOB considerablemente mayor. Lo anterior se evidencia en nuestros resultados, donde el deportista 1 aumentó 1.4 veces más su Fr respecto al reposo en comparación al deportista 2, quien aumentó 1.9 veces su Fr respecto al reposo en VT2, el cual representa el punto de disminución abrupta de la SmO_2 -*m.intercostales*.

La relación entre unidades normalizadas de ambos grupos musculares (Figura 3c) permite visualizar el efecto de la estrategia ventilatoria sobre el trabajo de ambos grupos musculares, así hasta VT2 el deportista que aumentó principalmente el Vc muestra mayor relación u.n que aquel que aumentó la Fr. Posterior a VT2, esta diferencia desaparece ya que el ejercicio a intensidades elevadas se mantiene principalmente por aumentos en Fr (11). Esto es muy relevante, pues en pruebas de larga distancia como la maratón los deportistas realizan la prueba a intensidad cercana o levemente por debajo de VT2, evitando aumentar la intensidad a pesar de una presentar una “buena sensación de ejercicio”, pues reconocen que de hacerlo el sustrato energético puede verse limitado durante la extensión temporal en la cual desean finalizar la competencia. Así, se puede inferir que si un deportista adopta como estrategia ventilatoria el aumento de Vc en vez de Fr para mantener valores elevados de $\dot{V}E$ podría ser lo adecuado pues el WOB realizado, reflejado en menor

desoxigenación en *m.intercostales*, no debiese disminuir el Q en músculos locomotores, reflejado en mayor desoxigenación de *m.vastus laterallis*, lo que podría evitar la aparición del reflejo metabólico y con ello limitar el rendimiento deportivo.

Este hallazgo es relevante para los entrenadores, pues fundamenta la incorporación de entrenamiento en musculatura respiratoria centrada en volumen (ej. hiperpnea isocápnica voluntaria (SpiroTiger™)), para así optimizar la estrategia ventilatoria durante el ejercicio físico, incrementando la capacidad vital y evitando aumentos en Fr, excepto en condiciones máximas, y con ello hacer más eficiente el WOB asociado al esfuerzo físico (18). En nuestra opinión esta estrategia ofrece beneficios, optimizando la extracción de oxígeno de la musculatura intercostal, mejorando el flujo sanguíneo local y probablemente permitiendo mejor rendimiento en pruebas de largas distancias donde la eficiencia del sistema respiratorio puede influir en la fatiga y el rendimiento físico final. Sin embargo, dado el alcance limitado de nuestros resultados y a las características descriptivas de nuestro estudio, sugerimos la realización de nuevas investigaciones con mayor número de participantes, para conocer si este fenómeno es replicable en una mayor cantidad de atletas y disciplinas deportivas. Además, es importante evaluar a deportistas de sexo femenino debido a que se han reportado diferencias en la mecánica respiratoria entre sexo (6), lo que podría relacionarse a mayor WOB en ejercicio.

Conclusión

En este estudio concluimos que dos corredores de maratón con similares

características antropométricas (peso, talla, IMC) y rendimiento físico ($\dot{V}O_2$ -máx), presentan similar aumento del WOB, pero diferentes cambios en las distintas fases de evaluación (reposo VT1, VT2, y $\dot{V}O_2$ -máx.). Esto puede ser explicado por las diferentes estrategias de los deportistas para aumentar la $\dot{V}E$ (frecuencia respiratoria (Fr) y/o volumen corriente (Vc)). Este hallazgo sugiere la incorporación de entrenamiento en musculatura respiratoria centrada en el Vc, evitando aumentos en Fr durante el esfuerzo físico aeróbico, y con ello hacer más eficiente el WOB asociado al esfuerzo físico. Es necesario realizar más investigaciones que demuestren estos resultados y permitan extrapolar este fenómeno en otras disciplinas deportivas.

Agradecimientos

Al Sr. Eduardo Moya por la asistencia en las mediciones realizadas en el Laboratorio de Fisiología del Ejercicio.

Conflicto de interés

Los autores declaran no presentar conflicto de interés.

Referencias

1. Saltin B, Astrand PO. Maximal oxygen uptake in athletes. *J Appl Physiol.* 1967;23(3):353–8.
2. Longo AF, Aquilino GD, Cardey ML, Lentini NA. VO2 max assessment in athletes: A thorough method comparison study between Yo-Yo test and direct measurement. *Apunts.* 2017;52(193):17–22.
3. Dominelli PB, Archiza B, Ramsook AH, Mitchell RA, Peters CM, Molgat-seon Y, et al. Effects of respiratory muscle work on respiratory and locomotor blood flow during exercise. *Exp Physiol.* 2017;11:1535–47.

4. Guenette JA, Sheel AW. Physiological consequences of a high work of breathing during heavy exercise in humans. *J Sci Med Sport*. 2007;10(6):341–50.
5. Vella CA, Marks D, Robergs RA. Oxygen cost of ventilation during incremental exercise to VO₂ max. *Respirology*. 2006;11(2):175–81.
6. Aaron EA, Johnson BD, Seow CK, Dempsey JA. Oxygen cost of exercise hyperpnea: Measurement. *J Appl Physiol*. 1992;72(5):1810–7.
7. Dempsey JA, Romer L, Rodman J, Miller J, Smith C. Consequences of exercise-induced respiratory muscle work. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006;151(2–3):242–50.
8. Power GA, Handrigan GA, Basset FA. Ventilatory response during an incremental exercise test: A mode of testing effect. *Eur J Sport Sci*. 2012;12(6):491–8.
9. Guenette JA, Querido JS, Eves ND, Chua R, William Sheel A. Sex differences in the resistive and elastic work of breathing during exercise in endurance-trained athletes. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(1):166–75.
10. Reinhard PA, Gerson EAM, Sheel AW, Archiza B. Quantifying the mechanical work of breathing in men and women during rowing. *Eur J Appl Physiol*. 2020;120(2):381–90.
11. Sheel AW, Romer LM. Ventilation and Respiratory Mechanics. *Comprehensive Physiology*. 2012;2(April):1093–142.
12. Contreras-Briceño F, Espinosa-Ramirez M, Llambias D, Carrasco M, Cerda F, López- A, et al. Reliability of NIRS portable device for measuring intercostal muscles oxygenation during exercise. *J Sports Sci*. 2019;37(23):2653–9.
13. Harriss D., Macsween A, Atkinson G. Standards for Ethics in Sport and Exercise Science Research. *Int J Sports Med*. 2017;38(14):1126–31.
14. Taylor H, Buskirk E, Henschel A. Maximal oxygen intake as an objective measure of cardio-respiratory performance. *J Appl Physiol*. 1955;8(1):73–80.
15. Mezzani A, Hamm LF, Jones AM, McBride PE, Moholdt T, Stone JA, et al. Aerobic exercise intensity assessment and prescription in cardiac rehabilitation: A joint position statement of the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation, the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabiliter. *Eur J Prev Cardiol*. 2013;20(3):442–67.
16. Seiler KS, Kjerland GØ. Quantifying training intensity distribution in elite endurance athletes: Is there evidence for an “optimal” distribution? *Scand J Med Sci Sport*. 2006;16(1):49–56.
17. Vogiatzis I, Athanasopoulos D, Habazettl H, Kuebler WM, Wagner H, Roussos C, et al. Intercostal muscle blood flow limitation in athletes during maximal exercise. *J Physiol*. 2009;587(14):3665–77.
18. Boone J, Barstow TJ, Celie B, Prieur F, Bourgois J. The interrelationship between muscle oxygenation, muscle activation, and pulmonary oxygen uptake to incremental ramp exercise: influence of aerobic fitness. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016;41(1):55–62.