

Rangel-Colmenero, B.; Hoyos-Flores, J.R.; Hernández-Cruz, G.; Miranda-Mendoza, J.; González-Fimbres, R.A.; Reynoso-Sánchez, L.F.; Naranjo-Orellana, J. (202x) Behaviour of Cholinesterases after Fatigue Conditions in Endurance Runners. Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte vol. X (X) pp. xx. [http://cdeporte.rediris.es/revista/___*](http://cdeporte.rediris.es/revista/)

ORIGINAL

COMPORTAMIENTO DE LAS COLINESTERASAS TRAS CONDICIONES DE FATIGA EN CORREDORES DE FONDO

BEHAVIOUR OF CHOLINESTERASES AFTER FATIGUE CONDITIONS IN ENDURANCE RUNNERS

Rangel-Colmenero, B.¹; Hoyos-Flores, J.R.²; Hernández-Cruz, G.¹; Miranda-Mendoza, J.³; González-Fimbres, R.A.⁴; Reynoso-Sánchez, L.F.⁵ y Naranjo-Orellana, J.⁶

¹ Profesores Investigadores de Tiempo Completo, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Organización Deportiva (México) blanca.rangelc@uanl.mx, german.hernandezcrz@uanl.edu.mx

² Estudiante de Doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Organización Deportiva (México) raul9991NBP@hotmail.com

³ Profesor Asociado Tiempo Completo, Facultad de Organización Deportiva, Universidad Autónoma de Nuevo León (México) mmj5-7_12@hotmail.com

⁴ Profesor Investigador de Tiempo Completo, Universidad Estatal de Sonora, Licenciatura en Entrenamiento Deportivo (México) robertocesues@gmail.com

⁵ Profesor Investigador de Tiempo Completo, Universidad Autónoma de Occidente, Licenciatura en Educación Física y Ciencias del Deporte (México) felipe_reynoso90@hotmail.com

⁶ Profesor Titular de Fisiología del Ejercicio, Universidad Pablo de Olavide, Departamento de Deporte e Informática (España) jnagore@gmail.com

AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGEMENTS

Agradecemos al entrenador Luis Francisco Ibarra Tobias y su equipo de atletas por su apoyo y ayuda en la realización de esta investigación.

Código UNESCO/ UNESCO Code: 2411 Fisiología Humana/ Human Physiology
Clasificación Consejo de Europa/ Classification Council of Europe: 2. Bioquímica del Deporte / Biochemistry of Sport; 6. Fisiología del Ejercicio / Exercise Physiology

Recibido 15 de noviembre de 2019 **Received** November 15, 2019

Aceptado 19 de abril de 2020 **Accepted** April 19, 2020

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un entrenamiento intenso en atletas de resistencia sobre el comportamiento de las colinesterasas (ChE) tras condiciones de fatiga y su relación con otros marcadores de carga interna. Participaron 18 atletas de sexo masculino especialistas en pruebas de resistencia. Se evaluó las ChE y dos índices de variabilidad de la frecuencia cardiaca en tres momentos diferentes. Se encontraron cambios significativos en las variables analizadas ($p < .001$) con tamaños de efecto muy grandes ($d > 0.9$) en los diferentes momentos y correlaciones moderadas entre variables ($p < .001$). El comportamiento de las ChE muestra un cambio significativo ($p < .001$) posterior al ejercicio y una relación con otros indicadores de carga interna. Nuestros resultados indican que las ChE tienen relación con la fatiga en el caso de los deportistas estudiados, pudiendo ser una medida para determinar la carga de entrenamiento.

PALABRAS CLAVE: Acetilcolinesterasa, Butirilcolinesterasa, Recuperación, Marcadores de carga interna, Variabilidad de la frecuencia cardiaca

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of intense training in endurance athletes on the behaviour of cholinesterases (ChE) after fatigue conditions and their relationships with other internal load markers. 18 male athletes specializing in endurance tests participated. ChEs and two index of heart rate variability were evaluated at three different times. Significant differences were found in the variables analysed ($p < .001$), with very large effect sizes ($d > 0.9$) at different times and moderate correlations between the variables ($p < .001$). The behaviour of the ChEs showed a significant change ($p < .001$) after exercise and relationships with other internal load indicators. Our results indicate that ChEs have a relationship with fatigue in the case of the studied athletes and may be a measure for determining the training load.

KEY WORDS: Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Recovery, Internal load markers, Heart rate variability

INTRODUCCIÓN

Cuantificar la carga de entrenamiento es considerado de suma importancia por su utilización en el control de las cargas de trabajo durante el ejercicio [1]. Es por ello que resulta fundamental cuantificar el estrés generado por el ejercicio conocido como carga interna [2], ya que permite determinar si el estímulo provocado por la carga externa [3] facilita el aumento en el rendimiento del atleta, con una recuperación óptima para cumplir con las adaptaciones del entrenamiento [2].

Cuando no hay un control de la carga y la densidad del entrenamiento es inadecuada, se puede ocasionar una fatiga inducida por el ejercicio o actividad física intensa, reduciendo, e incluso siendo incapaz de producir fuerza muscular voluntaria máxima [4]. Esta fatiga puede ser de tipo central o periférica, donde uno de sus principales componentes de esta última, son los cambios producidos en los mecanismos que se encuentran después de las uniones neuromusculares [5-7]. Este tipo de fatiga altera el mecanismo del potencial de acción nervioso y el potencial de acción muscular por diversos factores, entre ellos la desregularización de la neurotransmisión, disminución en la sensibilidad de receptores colinérgicos, entre otros [7].

Es conocido que los cambios fisiológicos y metabólicos parecen ser los causantes de esta fatiga [8,9]. En respuesta, existen varios métodos para controlar y medir la carga interna del entrenamiento, entre ellos está la variabilidad de la frecuencia cardiaca (VFC) que se ha descrito como indicador de estrés, fatiga, recuperación y adaptación al entrenamiento a través de la actividad del sistema nervioso autónomo y su interacción con el corazón [10-12]. Uno de los índices más utilizados en la VFC es la raíz cuadrada del valor medio de la suma de las diferencias al cuadrado de todos los intervalos latido a latido sucesivos del corazón (RMSSD) como medida de la actividad parasimpática, utilizando en mayor medida el logaritmo neperiano de la RMSSD (\ln RMSSD) por su mayor sensibilidad [13,14]. Por otra parte, Naranjo y colaboradores [15] han propuesto un parámetro para medir la actividad simpática llamado índice de stress (SS), que es el inverso del índice SD2 del Diagrama de Poincaré y representa un valor directamente proporcional a la actividad simpática.

A pesar de su importancia, muy pocos trabajos se han centrado en la neurotransmisión y, en particular, en las colinesterasas (ChE) y su posible papel en la fatiga [16]. Las ChE (acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa) son las enzimas encargadas de hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina (ACh) y han sido ampliamente estudiadas en investigación clínica. Sin embargo, estas enzimas parecen tener unas funciones biológicas adicionales cuyo conocimiento es aún incompleto [17,18]. La acetilcolinesterasa (AChE) se encuentra predominantemente en el corazón, cerebro y músculo esquelético modulando la ACh en la hendidura sináptica. La butirilcolinesterasa (BChE) predomina en hígado y en el suero sanguíneo, hidrolizando la ACh circulante y pudiendo remplazar la acción de AChE [18].

Se ha demostrado que uno de los factores que puede influir en la actividad de las ChE, es el ejercicio físico y se sabe que después de una sola sesión de actividad física aumenta considerablemente la actividad de estas enzimas en ratas [19]. Otra investigación, también realizada en ratas, estudió el comportamiento de la expresión de ChE y su relación con la fatiga [16], sin embargo, existe poca información sobre la actividad de las ChE en la actividad física en humanos. Hay dos estudios recientes [20,21], pero que no relacionan los cambios de las ChE con ningún efecto sobre la fatiga.

Asumimos, al menos a nivel teórico, que una de las posibles causas de fatiga podría ser la disminución de la neurotransmisión [7], e igualmente se puede inferir que el entrenamiento de resistencia es un inductor de fatiga, probablemente de origen neuromuscular, aunque poco se sabe al respecto [6]. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un entrenamiento intenso en atletas de resistencia sobre el comportamiento de las colinesterasas en relación con la fatiga y con otros marcadores de carga interna como el LnRMSSD y SS.

MATERIAL Y MÉTODOS

SUJETOS

Participaron 18 atletas entrenados de pruebas de resistencia de sexo masculino en (edad: 20.66 ± 2.79 años; estatura: 173.93 ± 6.17 cm; peso: 63.76 ± 7.63 Kg). Los sujetos formaban parte de un grupo de entrenamiento, de forma que seguían todos la misma rutina. Participaron en el estudio de forma voluntaria, para lo que firmaron un consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Autónoma de Nuevo León, siguiendo los estándares éticos de todos los principios expresados en la Declaración de Helsinki [22] para la realización de este estudio.

PROCEDIMIENTO

Al inicio del estudio se realizó un historial clínico a todos los atletas, así como una exploración física con el objetivo de descartar cualquier patología que afectara al diseño de la investigación. La sesión de entrenamiento se efectuó en una pista de tartán de 400 metros de la Universidad Autónoma de Nuevo León a las 16:00 horas en un ambiente moderadamente cálido y húmedo. El entrenamiento consistió en intervalos de 100, 200, 300, 400, 800 y 1000 metros a la máxima intensidad permitida para cada distancia, con periodos de recuperación entre cada intervalo de 2 minutos. Se realizaron tres tomas para las variables: la primera antes de comenzar el protocolo de estudio (BASAL), la segunda medición se realizó a los 15 minutos de finalizar la sesión de entrenamiento (FINAL) y la tercera muestra se tomó a la mañana siguiente de finalizar el entrenamiento (24H).

Las variables analizadas fueron el LnRMSSD, SS (mediciones no invasivas) y ChE (medición invasiva) como medidas de carga interna para controlar el estrés físico generado por el entrenamiento. La toma de muestras sanguíneas se realizó por venopunción y la sangre se almacenó en tubos de 4 mL con anticoagulante de heparina de sodio (BD Vacutainer Sodium Heparin) siguiendo el procedimiento del Clinical and Laboratory Standards Institute [23]. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para separar el plasma que fue almacenado a -80° C hasta su procesamiento.

ANÁLISIS DE COLINESTERASAS

Se utilizó el método de espectrofotometría colorimétrica mediante el Kit de ensayo de Acetilcolinesterasa (Acetylcholinesterase Assay Kit Colorimetric ab138871). Para la mezcla de reacción se prepara la solución estándar de acetilcolinesterasa y las diluciones seriadas para la curva de calibración. Se colocó los estándares, las muestras y los controles blancos en las placas. Las muestras fueron diluidas 1:5, más 50 μ L de la mezcla de reacción. Se deja encubando por 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz y posteriormente se analiza en un lector de absorbancia de microplaca Bio-Rad a 420 nm (iMark Bio-Rad Clinical Diagnostics, California, USA) hasta obtener el resultado para posteriormente corregir las concentraciones de la dilución. Se realizaron dos mediciones no consecutivas de las ChE y se calculó la confiabilidad en ICC = 0,79 (IC 95% = 0.70; 0.86). En este estudio se valoran en conjunto las dos isoformas de ChE: la AChE y la BChE.

VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDIACA

La monitorización de la VFC se realizó mediante el equipo Polar Team 2 (Polar Team², Polar Electro OY, Kempele, Finland) durante 10 minutos en un ambiente controlado y en posición supina. Los datos fueron analizados mediante el software Kubios v.2.2 (Kubios HRV, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland), para posteriormente calcular el logaritmo neperiano a los datos de RMSSD, como variable de la actividad parasimpática. Igualmente, a partir de los valores de SD2 se calculó el SS como medida de la actividad simpática, siguiendo el protocolo propuesto por Naranjo y colaboradores [15].

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el paquete estadístico SPSS en su versión 25 para el análisis de los datos (IBM Corp., Armonk, NY) utilizando un nivel de significancia de $p < .05$. Se realizó la prueba de normalidad utilizando el test de Shapiro-Wilk. Se utilizó en análisis ANOVA y posteriormente el post-hoc de Tukey HSD para la comparación de medias. Se utilizó la correlación de Pearson para las relaciones entre las variables. La fiabilidad de las mediciones de colinesterasa se evaluó mediante el análisis del coeficiente de correlación intraclase.

La magnitud del cambio por tomas fue evaluada por el tamaño del efecto (ES) usando la d de Cohen [24]. Se consideraron los intervalos propuestos por Hopkins y colaboradores [25] siendo 0.1, cambio pequeño; 0.3 moderado; 0.5 grande; 0.7 muy grande y 0.9 extremadamente grande.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observan los datos descriptivos de las variables durante las diferentes tomas, con media (M) y desviación estándar (DE). Además, se muestra el comportamiento y los cambios significativos en las variables analizadas. El LnRMSSD y el SS presentan un cambio significativo en la toma FINAL y estas dos variables junto con las ChE muestran un cambio significativo en la toma de 24H, pudiendo observar que el LnRMSSD y SS tienen un comportamiento inverso y similar.

Tabla 1. Medias y desviación estándar de las variables analizadas en los 3 momentos de la evaluación

	M ± DE BASAL	M ± DE FINAL	M ± DE 24H
ChE (mU/mL)	4195.11 ± 457.84	4354.75 ± 429.68	3104.34 ± 577.08* ^{§§}
LnRMSSD (UA)	1.84 ± 0.21	0.91 ± 0.26*	1.75 ± 0.13 ^{§§}
SS (UA)	10.42 ± 3.43	26.40 ± 10.42*	10.73 ± 3.92 ^{§§}

Nota. M = Medias de los datos. DE = Desviación estándar de los datos. BASAL = Previo al entrenamiento. FINAL = Al finalizar el entrenamiento. 24H = Un día después del entrenamiento. (*) Diferencia significativa ($p < .001$) con respecto a BASAL. (§) Diferencia significativa ($p < .01$) con respecto a FINAL. (§§) Diferencia significativa ($p < .001$) con respecto a FINAL.

Para reforzar los cambios significativos encontrados en la Tabla 1, se muestran en la Tabla 2 los valores del tamaño del efecto para observar la magnitud de cambio de las variables y que estos cambios no fueran al azar, donde encontramos que los cambios significativos valorados muestran tamaños del efecto muy grandes en la toma FINAL para el LnRMSSD y SS. Estas dos variables a su vez junto con las ChE, muestran también tamaños del efecto muy grandes para la toma FINAL.

Tabla 2. Magnitud de cambio de las variables mediante el tamaño del efecto

Tomas	ChE	LnRMSSD	SS
BASAL vs FINAL	0.360	-3.956	2.305
BASAL vs 24H	-2.108	-0.504	0.082
FINAL vs 24H	-2.484	4.323	-2.184

Nota. BASAL = Previo al entrenamiento. FINAL = Al finalizar el entrenamiento. 24H = Un día después del entrenamiento.

Al explorar los coeficientes de correlación de Pearson se encontraron correlaciones moderadas y estadísticamente significativas entre las ChE y LnRMSSD ($r = -.480$; $p = .001$) y entre las ChE y SS ($r = .419$; $p = .001$).

DISCUSIÓN

La contribución principal de este estudio fue mostrar el comportamiento de las ChE en plasma, así como su relación con otros marcadores de carga interna antes y después de un entrenamiento en fondistas universitarios.

Dentro de la literatura, se ha descrito que las ChE podrían tener modificación de su actividad influida por el ejercicio físico, esto se ha descrito en varias investigaciones tanto en ratas [16,19], como en humanos [20,21]. Además la han relacionado con la fatiga neuromuscular en ratas después de un protocolo de ejercicio [16]. Sin embargo, ninguno de los estudios realizados en humanos lo ha relacionado con su posible papel en torno a la fatiga. De acuerdo con nuestros resultados, los valores de ChE registrados tras la sesión de entrenamiento en la toma FINAL no muestran ningún cambio significativo ($p = 0.851$) ni relevante ($d = 0.36$). Estos resultados no coinciden con el incremento reportado en otros estudios [20,21], probablemente por el protocolo de ejercicio utilizado. En estos dos trabajos se realiza una actividad a baja intensidad: 30 min a 7 Km/h [20] y 60 min a 10.6 ± 1.7 Km/h [21]. Sin embargo, en nuestro estudio se analiza el efecto de un entrenamiento de intervalos de alta intensidad. Esto sugeriría que los niveles en plasma de ChE no se elevan por las altas tasas de hidrólisis el mecanismo de neurotransmisión por el tipo de ejercicio realizado.

Por otro lado, el descenso de las ChE que se presenta para la toma 24H con respecto a la toma BASAL y a la toma FINAL podría deberse a varios factores, entre ellos, un efecto para favorecer la neurotransmisión durante el proceso de recuperación. Otro, probablemente por factores internos que pudieran afectar su síntesis [17], como el ejercicio físico [20] y la regularización de la expresión del gen de acetilcolinesterasa (ACHE) en respuesta al estado fisiológico ocasionado por esos estímulos externos [18].

La idea de la relación con la neurotransmisión se vería reforzada por el hecho de que en nuestros resultados encontramos una correlación inversa entre las ChE y el LnRMSSD (actividad parasimpática) y una relación directa entre las ChE y el SS (actividad simpática). Se sabe que la actividad parasimpática está mediada por la liberación de ACh en la descarga eferente del nervio vagal [12,26] y en esta línea, un estudio de Canaani y colaboradores [27] demuestra que al descender la actividad de la AChE se acelera la recuperación de la frecuencia cardíaca (FC) y aumenta la VFC [28]. Sin embargo, otros autores [29] no encontraron ningún cambio post-ejercicio después de la inhibición de AChE en sujetos sanos, pero sí en cardiopatas [30].

El LnRMSSD, como era de esperar, desciende después del ejercicio y el SS aumenta inmediatamente en la toma FINAL respecto a la toma BASAL, por la suspensión casi total de la actividad parasimpática y elevación simpática, tal como

lo han reportado varios estudios [31-34]. Se ha descrito dentro de la literatura que esto se pudiera deber a que cuanto mayor es la intensidad relativa del ejercicio, mayor es la carga metabólica (H^+ , fosfato inorgánico, liberación de epinefrina), que tendrá un efecto sobre la estimulación barorrefleja y metabolorrefleja que estaría relacionado con una baja actividad parasimpática y una alta actividad simpática [10,35-37].

Posteriormente en la recuperación encontramos un aumento del LnRMSSD y un descenso del SS en la toma 24H respecto a la toma FINAL, alcanzando valores que no difieren de los valores iniciales de la toma BASAL. Esto es debido principalmente a la reactivación parasimpática por la regulación del descenso de catecolaminas circulantes, descenso de la presión arterial, y de los propios barorreflejos y metabolorreflejos. Esto a su vez tendrá un efecto reflejo eferente de la estimulación vagal que aumentará la actividad parasimpática y provocando una caída de la estimulación simpática [11,12,38-40]. Por otra parte, la normalización de los datos de VFC a las 24 horas de un ejercicio de estas características está bien documentada en la bibliografía [39,41].

Las limitaciones principales de este estudio fue el no tener acceso a una medición directa de los procesos de neurotransmisión. Por otro lado, y en vista de los resultados obtenidos, podría haber sido interesante observar el comportamiento de recuperación de las ChE posterior a las 24 horas de acabado el ejercicio. Sin embargo, los resultados encontrados nos permitirán incursionar sobre nuevas perspectivas del rol de las ChE en el ejercicio.

CONCLUSIONES

El comportamiento de colinesterasas podría ser un indicador de carga interna dado que presenta una relación aceptable con indicadores de la variabilidad de la frecuencia cardíaca. Esta función podría estar relacionada con su papel mediador en la neurotransmisión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Borresen J, Lambert MI. The quantification of training load, the training response and the effect on performance. *Sports Med.* 2009; 39(9): 779–795.
2. Halson SL. Monitoring Training Load to Understand Fatigue in Athletes. *Sports Med.* 2014; 44(2): 139–147.
3. Brink MS, Nederhof E, Visscher C, Schmikli SL, Lemmink KA. Monitoring load, recovery, and performance in young elite soccer players. *J Strength Cond Res.* 2010; 24(3): 597-603.
4. Edwards RH. Human muscle function and fatigue. *Ciba Found Symp.* 1981; 82: 1–18.

5. Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev.* 2001; 81(4):1725–1789.
6. Garrandes F, Colson SS, Pensini M, Seynnes O, Legros P. Neuromuscular fatigue profile in endurance-trained and power-trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39(1): 149-158.
7. Boyas S, Guével A. Neuromuscular fatigue in healthy muscle: underlying factors and adaptation mechanisms. *Ann Phys Rehabil Med.* 2011; 54(2): 88-108.
8. Lepers R, Maffiuletti NA, Rochette L, Brugniaux J, Millet GY. Neuromuscular fatigue during a long-duration cycling exercise. *J Appl Physiol.* 2002; 92(4): 1487-1493.
9. Noakes TD. Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. *Scand J Med Sci Sports.* 2000; 10(3): 123-145.
10. Buchheit M. Monitoring training status with hr measures: do all roads lead to Rome? *Front Physiol.* 2014; 5: 73.
11. Michael S, Graham KS, Davis GM. Cardiac Autonomic Responses during Exercise and Post-exercise Recovery Using Heart Rate Variability and Systolic Time Intervals – A Review. *Front Physiol.* 2017; 8: 301.
12. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation.* 1996; 93: 1043–1065.
13. Plews DJ, Laursen PB, Stanley J, Kilding AE, Buchheit M. Training adaptation and heart rate variability in elite endurance athletes: opening the door to effective monitoring. *Sports Med.* 2013; 43(9): 773-781.
14. Stanley J, Peake JM, Buchheit M. Cardiac parasympathetic reactivation following exercise: implications for training prescription. *Sports Med.* 2013; 43(12): 1259-1277.
15. Naranjo J, De La Cruz B, Sarabia E, De Hoyo M, Domínguez S. Two new indexes for the assessment of autonomic balance in elite soccer players. *Int J Sports Physiol Perform.* 2015; 10(4): 452–457.
16. Wen G, Hui W, Dan C, Xiao-Qiong W, Jian-Bin T, Chang-Qi L, De-Liang L, Wei-Jun C, Zhi-Yuan L, Xue-Gang L. The effects of exercise-induced fatigue on acetylcholinesterase expression and activity at rat neuromuscular junctions. *Acta Histochem Cytochem.* 2009; 42(5): 137-142.
17. Kutty KM. Biological function of cholinesterase. *Clin Biochem.* 1980; 13(6): 239-243.
18. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(4): 294-302.
19. Ryhänen R, Kajovaara M, Harri M, Kaliste-Korhonen E, Hänninen O. Physical exercise affects cholinesterases and organophosphate response. *Gen Pharmacol.* 1988; 19(6): 815-818.

20. Zimmer KR, Lencina CL, Zimmer AR, Thiesen FV. Influence of physical exercise and gender on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in human blood samples. *Int J Environ Health Res.* 2012; 22(3): 279-286.
21. Chamera T, Spieszny M, Klocek T, Kostrzewa-Nowak D, Nowak R, Lachowicz M, Buryta R, Ficek K, Eider J, Moska W, Ciężczyk P. Post-Effort Changes in Activity of Traditional Diagnostic Enzymatic Markers in Football Players' Blood. *J Med Biochem.* 2015; 34(2): 179-190.
22. World Medical Association. WMA Declaration of Helsinki—Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2013. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
24. Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Hillsdale, NJ: L. Erlbaum Associates; 1988.
25. Hopkins WG, Marshall SW, Batterham AM, Hanin J. Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science. *Med Sci Sports Exerc.* 2009; 41(1): 3-12.
26. Farías JM, Mascher D, Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. El marcapaso del corazón puede ser modulado por la acetilcolina mediante una vía delimitada a la membrana. *Revista de Educación Bioquímica.* 2010; 29(2): 29-38.
27. Canaani J, Shenhar-Tsarfaty S, Weiskopf N, Yakobi R, Assayag EB, Berliner S, Soreq H. Serum AChE Activities Predict Exercise Heart Rate Parameters of Asymptomatic Individuals. *Neurosci Med.* 2010; 1(2): 43-49.
28. Nóbrega ACL, dos Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL, Ribeiro JP. Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Res.* 2001; 11(1): 11-17.
29. Dewland TA, Androne AS, Lee FA, Lampert RJ, Katz SD. Effect of acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine on cardiac parasympathetic function in sedentary adults and trained athletes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(1): H86-H92.
30. Androne AS, Hryniewicz K, Goldsmith R, Arwady A, Katz SD. Acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine improves heart rate recovery after maximal exercise in patients with chronic heart failure. *Heart.* 2003; 89(8): 854-858.
31. Miranda-Mendoza J, Reynoso-Sánchez LF, Hoyos-Flores JR, Quezada-Chacón JT, Naranjo J, Rangel-Colmenero B, Hernández-Cruz G. Stress score y LnrRMSSD como parámetros de carga interna durante una competición. *Rev Int Med Cienc Act Fís Deporte.* 2020; 20(77): 21-35.
32. González-Fimbres RA, Ramírez-Siqueiros MG, Vaca-Rubio H, Moueth-Cabrera MT, Hernández-Cruz G. Relación entre VFC post-ejercicio y la carga interna de entrenamiento en triatletas. *Rev Int Med Cienc Act Fís Deporte.* 2020; 20(77): 87-102.

33. Abellán-Aynés O, López-Plaza D, Alacid F, Naranjo-Orellana J, Manonelles P. Recovery of Heart Rate Variability After Exercise Under Hot Conditions: The Effect of Relative Humidity. *Wilderness Environ Med*. In press.
34. Valenzuela PL, Sánchez-Martínez G, Torrontegi E, Vázquez-Carrión J, González M, Montalvo Z, Millet GP. Acute Responses to On-Court Repeated-Sprint Training Performed With Blood Flow Restriction Versus Systemic Hypoxia in Elite Badminton Athletes. *Int J Sports Physiol Perform*. 2019; 14(9): 1280-1287.
35. Houssiere A, Najem B, Ciarka A, Velez-Roa S, Naeije R, van de Borne P. Chemoreflex and metaboreflex control during static hypoxic exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288(4): H1724– H1729.
36. Fisher JP, Seifert T, Hartwich D, Young CN, Secher NH, Fadel PJ. Autonomic control of heart rate by metabolically sensitive skeletal muscle afferents in humans. *J Physiol*. 2010; 588(7): 1117–1127.
37. Ray CA, Hume KM. Sympathetic neural adaptation to exercise training in humans: Insights from microneurography. *Med. Sci. Sports Exerc*. 1998; 30: 387–391.
38. Goldberger JJ, Le FK, Lahiri M, Kannankeril PJ, Ng J, Kadish AH. Assessment of parasympathetic reactivation after exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290(6): H2446-H2452.
39. Stanley J, Peake JM, Buchheit M. Cardiac parasympathetic reactivation following exercise: implication for training prescription. *Sports Med*. 2013; 43(12):1259-1277.
40. Buchheit M, Laursen PB, Ahmadi S. Parasympathetic reactivation after repeated sprint exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: H133-H141.
41. Al Haddad H, Laursen PB, Ahmadi S, Buchheit M. Nocturnal heart rate variability following supramaximal intermittent exercise. *Int J Sports Physiol Perform*. 2009; 4(4): 435-447.

Número de citas totales / Total references: 41 (100%)

Número de citas propias de la revista / Journal's own references: 2 (4.87%)