



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DEPARTAMENTO DE CLINICAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TITULO: DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DEL DAÑO EN EL ADN DE LEUCOCITOS DE
SANGRE PERIFÉRICA EN EQUINOS SOMETIDOS A ESFUERZO FÍSICO DE ALTA INTENSIDAD.

AUTOR: MURIEL, Marcos Germán.

DIRECTOR: PICCO, Sebastián J.

LUGARES DE TRABAJO: Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino de Deporte e
Instituto de Genética Veterinaria Prof. Ing. Fernando N. Dulout (IGEVET)

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra. MONINA, Marta I. Dr. MATTIOLI, Guillermo A. Dr. TRIGO, Pablo.

2016

A mis padres, Jorge O. Muriel y Stella Maris Fernández

A mis hijos, Amparito y Agustín Muriel

A mi esposa, entrañable compañera María Celeste Espinaco

A mi familia

A mis Maestros, Dr. Eduardo Desmarás y Dr. Mario Marino

A mis amigos

A los caballos.

.....Sin todos ellos nada sería hoy posible.

*“Considero más valiente al que conquista sus deseos
que al que conquista a sus enemigos, ya que la
victoria más dura es la victoria sobre uno mismo.”*

Aristóteles Filósofo griego (384 AC-322 AC)

Índice

	<i>Página</i>
<i>Índice</i>	4
<i>Reconocimientos</i>	17
<i>Agradecimientos</i>	18
<i>Abreviaturas</i>	20
<i>Resumen</i>	25
1. Introducción	31
1.1. Marco Teórico	35
1.1.1. <i>Capacidad atlética de los equinos</i>	36
1.1.2. <i>Metabolismos energéticos</i>	42
1.1.2.1. <i>Fosforilación anaeróbica</i>	44

1.1.2.1.1. Fosfatos de Alta Energía.....	44
1.1.2.1.2. Glucólisis anaeróbica.....	47
1.1.2.2. Vía Aeróbica.....	49
1.1.2.2.1. Ciclo de Krebs y cadena de transporte mitocondrial.....	50
1.1.2.2.2. Oxidación de triglicéridos ó β - oxidación.....	52
1.1.2.3. Integración de las vías metabólicas durante el ejercicio.....	55
1.1.3. Propiedades metabólicas de las fibras musculares.....	57
1.1.4. Enzimas musculares.....	59
1.1.5. Causas de fatiga y daño tisular durante el ejercicio.....	61
1.1.6. Radicales libres.....	69
1.1.6.1. Estrés oxidativo y Daño oxidativo.....	72
1.1.6.2. Daño molecular inducido por especies reactivas de oxígeno.....	74
1.1.6.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	76

1.1.6.4. Estrés oxidativo como causa de daño durante o después del ejercicio	84
1.1.6.5. Sistemas de defensa biológica contra los ROS	87
1.1.7. Ácido Desoxirribonucleico (ADN.)	89
1.1.7.1. Estructura y función	89
1.1.7.2. Alteración de la estructura del ADN	93
1.1.7.3. Alteraciones en la estructura cromosómica	94
1.1.7.4. Métodos de estudio del daño en el ADN	96
1.1.7.5. Estrés oxidativo y daño oxidativo del ADN	97
1.1.7.6. Sistemas de protección del ADN contra el daño oxidativo	98
1.1.7.7. Determinación del daño inducido por el ejercicio al ADN celular	101
1.1.8. Lípidos y peroxidación lipídica	103
1.1.8.1. Daño por radicales libres	106

1.1.8.2. Peroxidación lipídica no enzimática.....	107
1.1.8.2.1. Reacción en cadena de la peroxidación lipídica.....	107
1.1.8.2.2. La estructura del ácido graso determina el producto final...111	
1.1.8.3. Peroxidación lipídica enzimática.....	113
1.2. Hipótesis y Objetivos.....	115
1.2.1. Hipótesis de trabajo.....	115
1.2.2. Objetivos Generales.....	115
1.2.3. Objetivos Particulares.....	115
2. Materiales y Métodos.....	117
2.1. Experimento 1.....	117
2.1.1. Animales experimentales.....	117
2.1.2. Test de ejercicio estandarizado.....	118
2.1.2.1. Protocolo de ejercicio.....	120

2.1.3. Ergo-espirometría.....	121
2.1.3.1. Equipo básico de ergo-espirometría.....	121
2.1.4. Toma de muestras sanguíneas.....	129
2.1.4.1. Tiempos de toma de muestra de sangre venosa.....	131
2.1.4.2. Procedimiento para la extracción.....	131
2.1.4.3. Procesamiento de las muestras de sangre.....	132
2.1.5. Determinación del daño en el ADN en leucocitos de sangre periférica mediante el empleo del ensayo cometa (comet assay) versión alcalina.....	133
2.1.5.1. Metodología.....	134
2.1.6. Determinación de la concentración de lactato en sangre.....	136
2.1.6.1. Metodología.....	137
2.1.7. Determinación de la peroxidación de lípidos de membrana y composición de ácidos grasos de glóbulos rojos de sangre periférica.....	138
2.1.7.1. Preparación de los eritrocitos.....	138

2.1.7.2. <i>Obtención de las membranas plasmáticas de los eritrocitos (fantasmas)</i>	139
2.1.7.3. <i>Peroxidación lipídica de fantasmas de eritrocitos analizado por quimioluminiscencia</i>	139
2.1.7.4. <i>Composición de ácidos grasos de membrana de eritrocitos por cromatografía</i>	141
2.1.8. <i>Determinación del hematocrito</i>	142
2.1.8.1. <i>Metodología</i>	142
2.1.9. <i>Determinación de urea sanguínea</i>	143
2.1.9.1. <i>Materiales y técnica de determinación</i>	144
2.1.10. <i>Determinación de CPK</i>	145
2.1.10.1. <i>Materiales y técnica de determinación</i>	146
2.2. Experimento 2:	148
2.2.1. <i>Animales experimentales</i>	148

	10
2.2.2. <i>Test de ejercicio estandarizado</i>	149
2.2.2.1. <i>Protocolo de ejercicio</i>	149
2.2.3. <i>Ergo-espirometría</i>	150
2.2.4. <i>Toma de muestras sanguíneas</i>	150
2.2.4.1. <i>Tiempo de toma de muestras</i>	150
2.3. <i>Análisis de los datos</i>	150
3. <i>Resultados</i>	152
3.1. <i>Experimento 1: Determinación del daño en el ADN durante el ejercicio y su</i> <i>relación con estrés oxidativo en equinos Árabes y sus cruzas</i>	152
3.1.1. <i>Determinación de daño en el ADN como indicador de daño sistémico durante</i> <i>el ejercicio</i>	152
3.1.2. <i>Consumo de oxígeno y concentración de lactato en sangre durante el test de</i> <i>ejercicio</i>	160

3.1.3. Composición de ácidos grasos de membrana y respuesta a la capacidad oxidativa valorada por quimioluminiscencia como indicadores de estatus oxidativo sistémico durante el ejercicio.....	164
3.1.4. Determinación de la concentración de leucocitos y eritrocitos durante el test de ejercicio.....	168
3.1.5. Determinación de Urea y CPK como indicadores de daño muscular.....	170
3.2. Experimento 2: Determinación de la cinética del daño en el ADN durante el ejercicio y su relación con el consumo de oxígeno y la concentración de lactato sanguíneo en equinos SPC.....	174
3.2.1. Determinación de daño en el ADN como indicador de daño sistémico durante el ejercicio en caballos SPC.....	174
3.2.2. Consumo de oxígeno y concentración de lactato en sangre durante el test de ejercicio.....	188
4. Discusión.....	192
5. Conclusiones.....	216
6. Bibliografía.....	218

Indice de Figuras

Figura 1.1. Representación diagramática de las alteraciones de las actividades séricas de la CPK y la AST luego de un episodio breve y agudo de rabdomiólisis (adaptado de Piercy, R.J. y Rivero, J.L.L. 2007).....	60
Figura 1.2. Relación entre intensidad, duración del ejercicio y aparición de fatiga. (Marlin D.J.M. 2007).	61
Figura 1.3. Equilibrio entre producción de ROS y defensas antioxidantes (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003).....	73
Figura 1.4. Reducción en los sistemas de defensa antioxidante sin aumento de los ROS (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003).....	73
Figura 1.5. Capacidad antioxidante adecuada con aumento en la producción de ROS (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003).....	73
Figura 1.6. Reducción de la capacidad antioxidante combinada con el aumento de la producción de ROS. (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003).....	73
Figura 1.7. Transporte mitocondrial como generador de ROS. (Marotte C. y Zeni S.N. 2013).....	78

Figura 1.8. Generación de anión superóxido durante la oxidación de oxihemoglobina a methaemoglobina. (Gohil K y col. 1988).....	79
Figura 1.9. Sitios capaces de producir especies reactivas del oxígeno (Adaptado de Scott K. Powers y col. 2011).....	83
Figura 1.10. Componentes de la molécula de ADN.....	91
Figura 1.11.a) Puentes de hidrógeno entre adenina/guanina y timina/citocina. b) Estructura lineal de la molécula de ADN.....	92
Figura 1.12. Estructura tridimensional de la molécula de ADN.....	93
Figura 1.13. Ciclo celular, puntos de control del ciclo celular y alternativas celulares ante el daño en el ADN (Modificado de Baserga, R. 1998).....	100
Figura 1.14. Peroxidación lipídica en membranas.....	106
Figura 1.15. Principales aldehídos generados durante la peroxidación lipídica.....	113
Figura 2.1. Esquema óptico de clasificación del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica.....	136
Figura 2.2. Protocolo de ejercicio incremental.....	149

Figura 3.1. Frecuencia de células con daño en el ADN antes (T0), durante el momento de máximo ejercicio (T1) y luego del ejercicio (T2).....	157
Figura 3.2. Variaciones de la intensidad del daño en el ADN durante el test de ejercicio.	158
Figura 3.3. Comportamiento del DDV y la frecuencia de células con daño en el ADN (FCD) durante el experimento 1, asumiendo los valores iniciales de los experimentos 2, 3 y 4 como tiempos T3.....	159
Figura 3.4. Comportamiento de las variables consumo de oxígeno y concentración de lactato en sangre durante el test de ejercicio.....	163
Figura 3.5. Relación existente entre consumo de oxígeno, concentración de lactato en sangre, DDV y FCD.....	159
Figura 3.6. Variación de la respuesta a la quimioluminiscencia en membranas de glóbulos rojos durante el test de ejercicio, expresado en cuentas por minuto (cpm).....	167
Figura 3.7. Relación existente entre los resultados obtenidos por quimioluminiscencia, DDV y FCD.....	168
Figura 3.8. Concentración de leucocitos durante el test de ejercicio (células/ μ l).....	169
Figura 3.9. Valor hematocrito durante el test de ejercicio (%).....	169

- Figura 3.10. Valores de urea en sangre (expresada en g%) obtenidos en equinos sometidos a un test de esfuerzo en los tiempos 0, pos 12 hs y pos 24 hs.....171
- Figura 3.11. Valores de CPK en sangre (expresada en mUI/ml) obtenidos en equinos sometidos a un test de esfuerzo en los tiempos 0, pos 12 hs y pos 24 hs.....173
- Figura 3.12. Frecuencia de células con daño en el ADN antes (T0), a los 8, 5 m/s (T1), durante el ejercicio momento de máximo esfuerzo (T2), al término inmediato del ejercicio (T3) y 30 min. Post ejercicio (T4).....180
- Figura 3.13. Variaciones de la intensidad del daño en el ADN durante el test de ejercicio (valores medios obtenidos de 7 caballos y 4 repeticiones).....181
- Figura 3.14. Cinética de la presencia de células grado 1 a lo largo del test de ejercicio...181
- Figura 3.15. Cinética de la presencia de células grado 2 a lo largo del test de ejercicio...182
- Figura 3.16. Cinética de la presencia de células grado 3 a lo largo del test de ejercicio...183
- Figura 3.17. Cinética de la presencia de células grado 4 a lo largo del test de ejercicio...183
- Figura 3.18. Cinética de la presencia de células grado 5 a lo largo del test de ejercicio...184

Figura 3.19. Comportamiento del DDV y la frecuencia de células con daño en el ADN (FCD) durante el experimento 2, asumiendo los valores iniciales de los SETs 2, 3 y 4 como tiempos T5.	185
Figura 3.20. Comportamiento de las variables FCD y células grado 2 a lo largo del ensayo.	187
Figura 3.21. Comportamiento de las variables DDV y de las células con diferentes grados de daño en el ADN a lo largo del ensayo.....	187
Figura 3.22. Comportamiento de las variables “consumo de oxígeno” y concentración de lactato en sangre durante el test de ejercicio.....	190
Figura 3.23. Relación existente entre consumo de oxígeno, concentración de lactato en sangre, DDV y FCD.....	191

Reconocimientos

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional de la Plata, por brindar formación PÚBLICA y GRATUITA de excelencia.

Al Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, por ir en busca de la excelencia, permitiendo la formación de Post Grado de todos sus docentes.

Al Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino de Deporte, en las personas de su ex Director PhD. Federico M. Boffi, y actual Director Dr. Pablo Trigo, por permitirme desarrollar el trabajo de tesis en este lugar.

Al Instituto de Genética Veterinaria Ing. Fernando N. Dulout (IGEDET), en la persona de su Directora Dra. Pilar Peral García, por permitirme utilizar equipamientos e instalaciones para poder desarrollar este trabajo.

A la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, en la persona de su Profesor Titular Dr. Alejandro Palacios, por haberme permitido realizar todas las determinaciones de peroxidación lipídica.

Al Servicio de Laboratorio del Hospital Escuela, en la persona de su Jefa la Dra. María Sandra Arauz, por haberme permitido utilizar las instalaciones y equipamientos para realizar las determinaciones de hematología y bioquímica sanguínea.

Agradecimientos

A mis Maestros Eduardo Desmarás y Mario Marino, quienes me mostraron el camino.

A Sebastián, mi director, por estar siempre dispuesto a ir contra el iceberg, por su infinita paciencia, y su generosidad.

A Yayo Pons y al Nono Costa por la confianza y haberme dado la primer oportunidad.

A mis amigos del Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales del Hospital Escuela, Violeta Ferreira, Huguito Hernandez, Roque Miranda, Ramón López, por el apoyo y permitir que mi camino no sea tan sinuoso, por soportarme diariamente, y por haberme dado el tiempo para que este trabajo sea posible.

Al Poroto Cittar y Federico Boffi, por haberme acompañado en este camino de búsqueda del conocimiento durante tantos años.

A César Arcemis, César Savignone y Alejandro Palacios por ayudarme con todas las muestras de peroxidación en glóbulos rojos en la Cátedra de Bioquímica.

A todos mis compañeros Lulu, Marcelo, Gaby, Toto, Silvia, Pato, Vero, Tigre, Titi, Cande, Coqui, Colo, Claudio, Pedro, Juan, Norma, Carla, Alberto, Leo y Vizcay, por su continua colaboración.

A Carli y Mabe, mis suegros, por el apoyo constante, por la ayuda en el cuidado de mis seres más queridos, mis hijos, y por tantos lindos momentos vividos.

A Geri y Leo, mis hermanos y a Fede mi cuñataí, por su amistad, por haberme llenado de sobrinos que tanto quiero y tanto amor me dan.

*A mi padre, por haberme enseñado que con perseverancia uno puede cumplir todo lo que se proponga, por sus consejos, por las charlas y largas caminatas en plaza Moreno, por haberme enseñado que el secreto de la vida es disfrutar el paso del tiempo.
“Te extraño tanto Viejo querido”.*

A mi madre, por haber forjado en mí valores como el respeto, la honestidad y la gratitud. Por ser incondicional, por haberme permitido volar en libertad, por su integridad, su valentía y su eterno amor.

A Amparito y Agustín, mis hijos, por iluminarme cada día y ser el sentido de mi vida.

A Celeste mi esposa, por ser mi fortaleza incondicional, por haberme dado una familia tan hermosa, por el “aguante”, por estar en todo momento, por el amor recibido, por caminar siempre “juntos a la par”.

A los caballos, nobles criaturas que me cautivaron desde mi infancia, por los cuales transcurrí este camino y quienes hoy permiten mi subsistencia, GRACIAS!. Todo lo que tengo se los debo a ustedes!



“Mi Caballo, Papá y Yo”. Autora: Amparo Muriel. 15/1/2016

Realizado durante la redacción final de la presente tesis.

Abreviaturas

$^1\text{O}_2$	Oxígeno molecular singlete
8-OHdG	8-hydroxydeoxyguanosina
8-OHGua	8-hydroxyguanina
Aa	Amino ácidos
ACE	Aberraciones cromosómicas estructurales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácidos grasos volátiles
AMP	Adenosina monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado
°C	Grados centígrados
Ca ⁺⁺	Calcio
CAT	Catalasa
CO ₂	Dióxido de carbono
Col.	Colaboradores
COX	Enzima ciclooxigenasa
CPK	Creatina fosfoquinasa
Cr	Creatinina

CuZnSOD	CuZn- Superóxido dismutasa
DDV	Índice de daño en el ADN, del inglés: DNA damage value
DMSO	Dimetilsufóxido
DS	Descarga sistólica
DSB	Ruptura de ambas cadenas de la molécula de ADN
ESR	Resonancia de espín electrónico, del inglés: Electron spin resonance spectroscopy
FAD	Dinucleótido de flavina
FADH2	Dinucleótido de flavina hidrogenado
FC	Frecuencia cardíaca
FCmax	Frecuencia cardíaca máxima
FCD	Frecuencia de células con daño en el ADN
GC	Gasto cardíaco
GC – MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
GPT	Guanosina trifosfato
GSH	Glutación
GSH-Px	Glutación peroxidasa
GSH-Rd	Glutación reductasa
GSSG	Glutación disulfidrilo
H ⁺	Hidrogenión
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
[Hb]	Concentración de hemoglobina arterial
Hb	Hemoglobina
HHE	Hidroxihexenal

HNE	Hidroxinonenal
HO•	Radical hidroxilo
HOO•	Radical hidroperoxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance, del inglés: "High Pressure Liquid Chromatography"
HX	Hipoxantina
IU	Indice de insaturación, del inglés: "Unsaturation Index"
K ⁺	Potasio
Kcal	Kilocalorías
Kg	Kilogramos
L•, PUFA•	Radical lipídico
LDH	Lactato deshidrogenasa
LH	Lípido
LHOO•	Hidroperoxilo
LO	Enzima lipooxigenasa
LO•, PUFA-O•	Radical alcoxilo lipídico
LOO•, PUFA-OO•	Radical peroxilo lipídico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Peroxidación lipídica
l/min.	Litros / minuto
Mb	Mioglobina
MDA	Malondialdehído
min	Minutos
MK	Mioquinasa
ml	Mililitros

ml/Kg/min	Mililitros – Kilogramo – Minuto
mm	Milímetros
μl	Microlitros
mmol	Milimoles
MN	Micronúclios
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa mitocondrial
m/s	Metros / segundos
Na ⁺	Sodio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida
NADH ₂	Dinucleótido de nicotinamida hidrogenado
NO•	Óxido nítrico
NO ₂ •	Dióxido de nitrógeno
O ₂	Oxígeno
O ₂ •-	Anión superóxido
ONOO ⁻	Ión Peroxinitrito
PCr	Fosfocreatina
PFK	Fosfofructoquinasa
Pi	Fosfato inorgánico
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PMN	Polimorfonucleares
PUFAs	Ácidos grasos poli-no-saturados
PUFA-H	Ácido graso poli-no-saturado (explicitando el H a perder)
REB	Reparación por escisión de bases
REN	Reparación por escisión de nucleótidos
ROO•	Radical peroxilo

ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés: reactive oxygen species
RNS	Especies reactivas de nitrógeno, del inglés: reactive nitrogen species
SCE	Intercambios de cromátidas hermanas
SCGE	Electroforesis en gel de células aisladas o análisis cometa, del inglés: Single Cell Gel Electrophoresis
SD	Desviación estándar
SET	Test de ejercicio estandarizado
SOD	Superóxido dismutasa
seg	Segundos
SPC	Sangre pura de carrera
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, del inglés: thiobarbituric reactive substances
tBHP	Tert butil hidroperóxido
TCA	Ciclo del Ácido Tricarboxílico
UQH-	Ubisemiquinona
VO ₂	Consumo de oxígeno
VO ₂ max	Consumo máximo de oxígeno
X	Xantina
XDH	Xantina deshidrogenasa
XH	Iniciador no radical
XO	Xantina oxidasa

Resumen:

El caballo es un atleta desde su nacimiento y sus órganos están preparados para tal fin. La capacidad atlética de los caballos es atribuible a un número de adaptaciones fisiológicas, que en algunos casos no son afectadas por el entrenamiento como por ejemplo, el tamaño pulmonar, mientras que otros cambian en respuesta al mismo, como por ejemplo el volumen sanguíneo. Durante el ejercicio numerosas acciones fisiológicas se ven forzadas a niveles muchas veces alarmantes y se generan numerosas variaciones en el medio interno. La actividad muscular es necesaria para poder moverse y para que ello sea posible implica la utilización de diferentes vías metabólicas, con el consiguiente incremento de diferentes metabolitos, muchos de los cuales son potencialmente tóxicos. Durante el ejercicio aumenta el consumo de oxígeno (VO_2), que es utilizado para producir energía en las mitocondrias de las fibras musculares, generando especies intermedias llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción de ROS durante el ejercicio puede llegar a ser abrumadora para el sistema de defensa antioxidante y plantear problemas potenciales, induciendo la pérdida de la integridad de las membranas y disfunciones celulares, afectando a lípidos celulares, proteínas y ADN. Uno de los aspectos menos estudiados relacionados con el ejercicio son las consecuencias sistémicas derivadas de los cambios producidos en el medio interno. Por tal razón, el propósito de esta tesis fue establecer la existencia y el comportamiento del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica de equinos durante ejercicio de alta intensidad, así como las consecuencias del ejercicio en los elementos formes de la sangre y su relación con indicadores de daño por estrés

oxidativo. Se realizaron dos experimentos los que incluyeron test de ejercicio de alta intensidad en cinta ergométrica, para lo cual se utilizaron 7 caballos árabes y sus cruza en el primero y 7 caballos SPC (Sangre Pura de Carreras) en el segundo. Los primeros 7 animales fueron utilizados para determinar la presencia de daño en la molécula de ADN de leucocitos de sangre periférica durante el test de ejercicio, la presencia de alteraciones oxidativas en la membrana de eritrocitos durante el test de ejercicio de alta intensidad, la asociación de estas variables con el consumo de oxígeno y la concentración de lactato en sangre y la asociación de estas variables con el comportamiento global de eritrocitos y leucocitos, así como con indicadores indirectos de daño tisular y actividad metabólica como CPK y urea. El segundo experimento fue para establecer la cinética del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica de 7 equinos SPC sometidos a un test de ejercicio de alta intensidad y su relación con el consumo de oxígeno y los niveles de lactato en sangre, extendiendo el ensayo hasta 30 minutos post- ejercicio. Los principales resultados obtenidos permitieron concluir que el ejercicio físico de alta intensidad en equinos produce daño en la molécula de ADN de leucocitos de sangre periférica. Evidenciando además que el esfuerzo extremo no solo afecta al tejido muscular sino que tienen consecuencias sistémicas. Se demostró que dicho daño se produce básicamente durante el desarrollo del ejercicio y no posterior al mismo y que el máximo nivel de daño en el ADN coincidió con el máximo consumo de oxígeno. Dicha observación permitió asumir que la presencia de daño en el ADN se vinculó a la producción de especies reactivas del oxígeno, las cuales generaron una condición pro-oxidante a nivel sanguíneo, trasladando los efectos musculares del ejercicio al terreno sistémico. Se corroboró la condición pro-oxidante de la sangre al establecer alteraciones en el patrón de ácidos grasos

de membrana de eritrocitos, los cuales sufrieron una significativa reducción en el porcentaje de ácidos grasos poli-insaturados, la inversión de la relación de ácidos grasos saturados/insaturados, el aumento del índice de insaturación y el aumento de peroxidación de lípidos de membrana medidos por quimioluminiscencia. También fue posible establecer una conducta bifásica del daño en el ADN, con un pico en el momento de máximo esfuerzo y un segundo pico a los 30 minutos pos ejercicio. Dado que el primero coincidió con el máximo consumo de oxígeno y con la condición pro-oxidante de la sangre es posible especular sobre el origen diferencial de dicho daño. En tal sentido, es probable que tras el ejercicio adquieran más relevancia factores tales como mediadores inflamatorios, liberación de ROS por PMN y el fenómeno de isquemia-reperfusión. Es por ello que futuros estudios serán necesarios para dilucidar la responsabilidad de cada uno de los factores generadores de daño durante el ejercicio en equinos bajo modelos de ejercicio como el planteado en el presente ensayo. Finalmente, durante el desarrollo de los 2 experimentos, los animales utilizados para cada repetición fueron los mismos. Esto nos permitió establecer que tras un período de treinta días el daño en el ADN producido durante el ejercicio fue totalmente subsanado.

Summary:

The horse is an athlete from birth and its body is prepared for this purpose. The athletic ability of horses is attributable to a number of physiological adaptations, which in some cases are not affected by training such as lung size, while others change in response thereto, such as blood volume. During the exercise, numerous physiological actions are increased many times often alarming levels and significant variations are generated in the internal environment. Muscle activity is required to move. To make these possible different metabolic pathways must be put into operation, with the consequent increase of different metabolites, many of which are potentially toxic. During exercise an increase of oxygen consumption (VO_2) occurs. This is used to produce energy in the mitochondria of muscle fibers, creating intermediate species called reactive oxygen species (ROS).

ROS production during exercise can become overwhelming for the antioxidant defense system and pose potential problems, leading to the loss of membrane integrity and cellular dysfunction, affecting cellular lipids, proteins and DNA. One of the least known aspects of exercise is the systemic consequences for changes in the internal environment. For this reason, the purpose of this thesis was to establish the existence and behavior of DNA damage of peripheral blood leukocytes of horses during high-intensity exercise, the effects on cellular components of blood and their relationship with indicators of oxidative stress. Two experiments using horses subjected to high-intensity exercise treadmill test were performed. In the first seven Arabian horses and their crossbreeds were used. In the second seven horses SPC (Thoroughbred Racing) were used. The first experiment were used to determine DNA damage from peripheral blood

leukocytes, the presence of oxidative changes in the erythrocyte membrane, the association between these variables and oxygen consumption and blood lactate concentration, the association between these variables with the overall performance of erythrocytes and leukocytes, as well as indirect indicators of tissue damage and metabolic activity like CPK and urea. The second experiment was conducted to establish the kinetics of DNA damage in peripheral blood leukocytes of horses subjected to a test of high-intensity exercise. They also study the association between DNA damage, oxygen consumption and blood lactate concentrations, extending the trial to 30 minutes post exercise. The main results obtained allowed to conclude that the high-intensity exercise in horses causes damage to the DNA molecule of peripheral blood leukocytes. Showing that the extreme stress not only affects muscle tissue but have systemic consequences. It was shown that such damage occurs primarily during the development of exercise and not after completion. In addition, the maximum level of DNA damage coincided with the maximum oxygen consumption. This observation allowed assuming that muscle activity produced an increase in ROS concentration, generating a pro oxidant blood state, responsible for DNA damage of peripheral blood leukocytes. Transferring muscle exercise effects to systemic level. Confirmation of prooxidant blood condition was established to study the pattern of fatty acids erythrocyte membrane. A significant reduction in the percentage of polyunsaturated fatty acids, the inversion of the ratio of saturated / unsaturated fatty acids, the increased rate of unsaturation and increased membrane lipid peroxidation measured by chemiluminescence were observed. It was also possible to establish a biphasic behavior of DNA damage, with a peak at the time of maximum effort and a second peak at 30 minutes post-exercise. Since the first

peak was simultaneous with the maximum oxygen consumption and the pro-oxidant blood condition is possible to speculate that the second peak of damage has a different origin. In this sense, it is likely that after the exercise acquire more relevance factors such as inflammatory mediators, PMN release of ROS and the phenomenon of ischemia-reperfusion. Future studies will be needed to clarify the responsibility of each of the factors in the genesis of damage during exercise in horses under exercise models as those raised in this thesis. Finally, during the development of the two experiments, animals used for each repetition were the same. This established that after a period of thirty days the DNA damage produced during exercise was completely repaired.

1. INTRODUCCIÓN

El caballo es sin lugar a dudas un atleta extraordinario, una característica que es el resultado de la evolución de los mismos como animales de pastoreo. La supervivencia de esta especie fue realizada por la velocidad para escapar de los depredadores, y la resistencia necesaria para recorrer largas distancias en busca de alimento y agua. Estas características fueron posteriormente modificadas o mejoradas por el hombre mediante la cría selectiva.

Importantes manadas de caballos salvajes recorrían la estepa de Asia Central en el cuarto milenio antes de nuestra era. Este tiempo corresponde al final del neolítico, y es en ese momento cuando los hombres de la cultura Botai habrían aprendido a domesticarlos por primera vez, hace 5.500 años, los mismos ya operaban una selección entre estos animales favoreciendo algunas características ya que los destinaban preferentemente para producción de alimento y leche, y no fue sino hasta 3500 - 3000 años AC que se los comenzó a utilizar como medio de locomoción según se evidencia en diferentes estudios arqueológicos (Outram A. y col. 2009). Es así que el caballo ha acompañado al hombre en su evolución. Siendo utilizado como fuente de alimento, medio de transporte y de carga, y además una herramienta importante de combate. Con el avance tecnológico fue perdiendo importancia como elemento de trabajo, y su utilidad derivó cada vez más como animal de deporte y recreación.

Hoy el caballo es considerado un atleta de elite desempeñándose en diferentes disciplinas hípcas, siendo capaz de llevar a cabo una amplia gama de ejercicios, tales como saltar, correr carreras de velocidad y resistencia, entre otras. No importa cuál sea la disciplina de interés todas las investigaciones giran

en torno al desempeño atlético y diversas formas de mejorarlo. Se considera que la ciencia equina sobre los ejercicios en la era moderna surgió en 1967 con la publicación de la tesis doctoral de Sune Persson (Persson S. 1967). Fue la primera investigación que registró los datos generados por los equinos que se ejercitaban en una cinta ergométrica de alta velocidad. El subsiguiente uso generalizado de dichas cintas tuvo mucho que ver con la definición del estado actual del conocimiento sobre la fisiología equina básica y aplicada al ejercicio.

El caballo es un atleta desde su nacimiento y sus órganos están preparados para tal fin. La capacidad atlética de los caballos es atribuible a un número de adaptaciones fisiológicas, que en algunos casos no son afectadas por el entrenamiento como por ejemplo, el tamaño pulmonar, mientras que otros cambian en respuesta al mismo, como por ejemplo el volumen sanguíneo (Hinchcliff, K.W. y Geor, R.J. 2008). Durante el ejercicio numerosas acciones fisiológicas se ven forzadas a niveles muchas veces alarmantes y se generan numerosas variaciones en el medio interno. La actividad muscular es necesaria para poder moverse mientras se desarrolla el ejercicio físico. Cada actividad implica la utilización de diferentes vías metabólicas, y así un incremento en los diferentes metabolitos, muchos de los cuales son potencialmente tóxicos. Durante el ejercicio aumenta el consumo de oxígeno (VO_2), que es utilizado para producir energía en las mitocondrias de las fibras musculares, generando especies intermedias llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS: del inglés "reactive oxygen species"). Estas ROS normalmente no son un problema en el cuerpo en reposo ya que el sistema de defensa antioxidante puede controlarlas. Sin embargo, a veces la producción de ROS puede llegar a ser abrumadora para el sistema de defensa antioxidante y plantear problemas potenciales, induciendo

pérdida de la integridad de las membranas y disfunciones celulares, afectando a los lípidos celulares, proteínas y ADN, situación que se conoce como estrés oxidativo (Clarkson P.M. y Thompson H.S. 2000). Las ROS pueden ser perjudiciales y se las puede vincular con varias enfermedades tales como la diabetes, enfermedades del corazón y cáncer, osteoporosis, envejecimiento y también con algunos de los efectos deletéreos de ejercicio (Sen, C. 1995; Kanter, M. M 1994, Marotte C y Zeni SN. 2013). La peroxidación lipídica es uno de los fenómenos más importantes causado por los radicales libres, aunque el daño de las proteínas y ácidos nucleicos han sido ampliamente descritos (Dillard y col. 1978; Avellini L. y col. 1999). Desde que se relacionó al ejercicio físico con el daño oxidativo de los tejidos ocurrido en humanos investigado por Dillard y col. en 1978, numerosos estudios se han dedicado al impacto del ejercicio en el equilibrio oxidante-antioxidante en hombre y animales (Sen y Paker 2000). Ha sido demostrado que el ejercicio puede inducir daño de los tejidos por la oxidación de componentes celulares, tales como lípidos de la membrana, proteínas, carbohidratos y de ácidos nucleicos (Clarkson P.M. y Thompson H.S. 2000). Hay evidencia creciente para sugerir que la producción de ROS puede contribuir a los disturbios inducidos por el ejercicio en la homeostasis del músculo así como la fatiga y lesión de la fibra muscular (Powers y Lennon 1999), conduciendo a la intolerancia del ejercicio y al bajo rendimiento atlético en diversas especies animales (Sen y Paker 2000).

El extenso uso de los equinos como atletas ha generado mucho interés en el papel que juegan los oxidantes en la producción de daño durante el ejercicio en términos de la fisiología de la fatiga muscular, la fisiopatología de las miopatías, el aumento de la performance con el uso de antioxidantes, y cuestiones

relacionadas con el bienestar (Millis y col. 1997; Avellini L. y col. 1999; Deaton y col. 2002, Kirschink y col. 2002a,b; Marlin D. y col. 2002; Willams y col. 2001, 2003a,b, 2004; de Molffarts B. y col. 2005).

Uno de los aspectos menos estudiados relacionados con el ejercicio y la generación de ROS son las consecuencias sistemicas derivadas de los cambios producidos durante el esfuerzo (Nikolaidis M. G. y Jamurtas A. Z. 2009). Por tal razón, el propósito de esta tesis fue establecer la existencia y el comportamiento del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica de equinos durante ejercicio de alta intensidad, las consecuencias del ejercicio en los elementos formes de la sangre y su relación con indicadores de daño por estrés oxidativo.

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. Capacidad atlética de los equinos

El caballo ha sido utilizado como modelo de la fisiología del ejercicio único por años debido a su gran capacidad atlética. Este no es sólo una versión más grande del atleta humano, sino un animal con diversas características propias. Su capacidad atlética superior está estrechamente relacionada con su alta capacidad aeróbica máxima, grandes reservas intramusculares de energía (glucógeno), alto volumen mitocondrial en el músculo, la habilidad de aumentar la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre al inicio del ejercicio (contracción esplénica), gran capacidad anaerobia, termorregulación eficaz y la eficiencia de la marcha (Hinchcliff, K.W. y Geor, R.J. 2008).

Sin lugar a dudas una de las principales características que presenta el equino por sobre muchas otras especies animales, incluidos los seres humanos, es su capacidad aeróbica máxima o consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}), que es aproximadamente 2,6 veces mayor que la del bovino de tamaño similar, y sobre una base de peso corporal es de aproximadamente 2 - 2,5 veces mayor que la de hombres altamente entrenados (Jones JH 1989). El consumo de oxígeno (VO_2) es la cantidad de oxígeno (O_2) que el organismo puede absorber, transportar y consumir en un tiempo determinado. Al máximo volumen de oxígeno en la sangre que el organismo puede metabolizar se lo denomina Consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) o Capacidad Aeróbica (Ferrero J.A., Fernández Vaquero A., 1995). La diferencia del oxígeno contenido entre inhalación y exhalación se mide para saber cuánto oxígeno es consumido en un minuto. El

VO_2 puede ser medido en litros por minuto (L/min) ó en mililitros por kilogramo de peso corporal por minuto (ml/kg/min) y representa la tasa de consumo (Poole D.C, 2003). El VO_2 es entonces un parámetro, que nos indica el metabolismo aeróbico de un animal durante las diferentes cargas de trabajo. En otras palabras podemos decir que el VO_2 mide la función de los sistemas cardiovascular y respiratorio, que va desde la entrada del aire por los ollares hasta la utilización del O_2 en la cadena respiratoria mitocondrial, e involucra una serie de procesos que pueden dividirse en tres etapas: A) Respiratoria: compuesta por la ventilación pulmonar, la difusión del O_2 a través de la pared alveolar y la afinidad de la hemoglobina del glóbulo rojo por el O_2 (hematosis), B) Cardiovascular: involucra la frecuencia cardíaca (FC), la descarga sistólica (DS) y la presión sanguínea, que son los encargados de regular la perfusión pulmonar. A su vez, el flujo sanguíneo a nivel muscular y la densidad capilar son los encargados de permitir la difusión y extracción del O_2 por la fibra muscular, C) Muscular: la disponibilidad de sustratos energéticos, los diferentes tipos de fibras musculares, la actividad enzimática y la concentración de mioglobina son los que determinan la utilización del O_2 por el músculo.

Los equinos presentan adaptaciones estructurales que mejoran la oxigenación de la sangre en los pulmones, la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, y la capacidad de transportar oxígeno a los tejidos. La cadena de transporte de oxígeno, que va desde el aire a los músculos, en los caballos es adecuada para el transporte de grandes volúmenes de oxígeno requeridos para soportar la elevada tasa metabólica durante diferentes tipos de ejercicios.

El transporte de oxígeno depende de la capacidad de transferencia de oxígeno desde el aire ambiental a la sangre capilar pulmonar. Esto implica el movimiento de aire desde fuera del caballo a los alvéolos, y posterior difusión de

oxígeno hacia el capilar pulmonar. Han sido registrados parámetros ventilatorios en caballos Pura Sangre de Carrera (SPC) como volúmenes de aire corrientes de aproximadamente 12 – 18 litros y la ventilación minuto de hasta 1800 litros/minuto durante un ejercicio máximo en cinta ergométrica (Art T. y col. 1990). Estas extraordinariamente altas tasas de flujo son generadas por diferencias de presión entre el espacio pleural y el aire ambiente. La generación de presiones alternantes negativa y positiva en el tórax durante el ejercicio es el resultado de una interacción complicada entre los músculos locomotores y respiratorios. La difusión de oxígeno de la luz alveolar a la sangre capilar se consigue debido a la fina membrana que separa el alvéolo de la sangre capilar, y la gran área de superficie que presentan los pulmones de los equinos. Los equinos poseen pulmones que duplican en tamaño al de los bovinos, con un área de superficie de intercambio gaseoso de 1.6 veces mayor que el bovino (Constantinopol M. y col. 1989), un número total de alvéolos de 10^{10} – 10^{11} y una superficie pulmonar de unos 2500 m², en comparación con los seres humanos que disponen de una superficie pulmonar de unos 85 m² (Marlin y Nankervis 2003).

El transporte de oxígeno desde los pulmones a los músculos en ejercicio se logra por la circulación. La gran capacidad aeróbica en los caballos está asociada con un número de factores, incluyendo un mayor gasto cardíaco máximo y una alta concentración de hemoglobina (Jones JH 1989) entre otros. El gasto cardíaco (GC) es el producto de la frecuencia cardíaca (FC) y la descarga sistólica (DS), y es uno de los factores determinantes en la entrega de la sangre, y por lo tanto de oxígeno, a los tejidos. El gasto cardíaco (GC) en los equinos puede superar los 300 litros/ minuto (Fedde y Wood 1993; Kinding y col. 2001), por el incremento de la DS y de la FC, caracterizándose los atletas de élite por presentar una mayor

DS en comparación con la media de la población (Evans D. 1994; Poole D.C 2003). Mientras que el gasto cardíaco de los caballos SPC durante el ejercicio intenso puede ser de hasta 400 litros/minuto, la frecuencia cardíaca máxima no es diferente entre caballos, vacas, y los hombres (Hinchcliff K.W. y Geor R.J. 2008). No obstante la FC basal de un caballo puede aumentar hasta 8 veces con ejercicio intenso versus aproximadamente 3 a 4 veces en los atletas de élite humano. Los caballos, con un peso del corazón de 0.9 - 1.1% del peso corporal, tienen proporcionalmente grandes corazones y, por tanto mayor volumen sistólico, lo que explica el gran gasto cardíaco en esta especie. El tamaño del corazón como proporción del peso corporal varía entre las diversas razas de caballos, las razas de tiro tienen corazones proporcionalmente mucho más pequeños que las razas de carreras (Hinchcliff K.W. y Geor R.J. 2008).

Además del gasto cardíaco, la entrega de oxígeno está limitada por la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre. Los equinos tienen la capacidad de incrementar rápidamente la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre por incrementar la concentración de hemoglobina sanguínea a través de la contracción del bazo. La esplenotomía anticipada al ejercicio y durante el mismo incrementa la masa de células rojas circulantes sin un incremento concomitante del volumen plasmático (Persson 1967). La esplenotomía en el equino es capaz de liberar a la circulación hasta 12 litros de glóbulos rojos (Fenger C.K. y col. 2000), haciendo que el hematocrito pase de 38 – 44% (valores de reposo) a 65 – 70% durante el ejercicio máximo, incrementando también la concentración de hemoglobina arterial ([Hb]) en un 100 % respecto de los valores de reposo (Poole 2003), aumentando de esta forma la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre arterial en más de 50% a los tejidos periféricos (Hinchcliff y

Geor 2008). El efecto de la contracción del bazo en la concentración plasmática de hemoglobina es suplementado por la reducción en el volumen plasmático durante el ejercicio (McKeever K.H., Hinchcliff K.W., Reed S.M., y col.1993). La falta de los efectos beneficiosos de esta autoinfunción de eritrocitos al comienzo del ejercicio se hace evidente en los caballos cuyos bazos han sido removidos. Como lo demuestran trabajos realizados con caballos esplenectomizados, los cuales tuvieron un menor hematocrito durante el ejercicio, la hemodinámica sistémica se vio alterada, incluyendo presiones arteriales auriculares y pulmonares derechas inferiores, y menor capacidad para realizar ejercicio vigoroso (McKeever K.H. y col. 1993).

El paso final en el proceso de transporte del oxígeno es la utilización de este en el músculo. La alta tasa de metabolismo aeróbico en el músculo de los caballos es favorecida por una alta densidad capilar en el mismo, la que favorece la entrega de oxígeno, y la alta actividad enzimática en la utilización de la energía. La mitocondria suministra la energía para la contracción muscular. Cuanto mayor sea su cantidad por unidad de peso muscular, mayor será la capacidad de oxidación del músculo. Los músculos de los equinos contienen aproximadamente el doble de concentración de mitocondrias que los músculos del bovino, animales con similar tamaño pero con mucho menos capacidad aeróbica (Kayar S.R. y col 1989). Esta superioridad en la capacidad aeróbica muscular, cuando es sustentada por una disponibilidad de sustrato y una distribución de oxígeno apropiadas, permite una mayor capacidad aeróbica máxima (Hinchcliff K.W. y Geor R.J. 2008).

Los niveles elevados de sustrato son importantes para proveer el combustible necesario para la contracción muscular durante el ejercicio. El flujo

de glucosa, desde la sangre hacia el músculo y posteriormente a las mitocondrias, solo proporciona una cantidad reducida (<10%) de la energía usada durante un ejercicio intenso, probablemente debido a los límites del índice de transporte de estos compuestos durante la actividad física (Schlipf J.W. 1994). Por lo tanto la presencia de grandes cantidades de sustratos disponibles en las proximidades de las mitocondrias es esencial para que los caballos puedan tolerar un ejercicio extenuante. Por otro lado las fibras musculares presentan una alta cantidad de energía almacenada como glucógeno, con una capacidad buffer 50% mayor que la de un atleta humano. Esta capacidad buffer está dada por bicarbonato (HCO_3^-), proteínas, fosfatos y el dipéptido carnosita (beta alanina + l-histidina), siendo el sistema del HCO_3^- el más eficiente (Pösö 2002). Estas características, hacen que el tejido muscular de los equinos, sea capaz de soportar durante un ejercicio condiciones adversas para la vida celular como son $\text{pH} < 7$, temperaturas de 40 – 41°C, etc.

Es así que a los equinos hay que incluirlos dentro de las especies domésticas súper atletas ya que se trata de animales con una alta capacidad oxidativa, debido a que presentan un $\text{VO}_{2\text{max}}$ entre 40 y 60 veces más alto que los valores de reposo (3 a 4 ml/kg/min), pudiendo superar durante un ejercicio los 200 ml/kg/min (Evans D. and Rose R., 1988; Kinding C.A. y col. 2001). En atletas humanos de elite, el $\text{VO}_{2\text{max}}$ no supera en 20 veces los valores basales (Ferrero J.A., Fernández Vaquero A., 1995). Cuanto más elevado sea el VO_2 y más rápido se logre llegar a este, menor necesidad hay de recurrir al metabolismo anaeróbico, con la consecuente formación de ácido láctico, liberación de hidrogeniones (H^+) y la posible aparición de fatiga periférica (Vervuert I. 2011).

El gasto de energía de los caballos ejercitados se eleva debido al costo de energía del trabajo de los músculos esqueléticos, el aparato respiratorio y el sistema cardiovascular (Martin-Rosset 2008). El VO_2 se supone que es el mejor criterio del gasto energético y en los caballos, la velocidad a la que el VO_2 puede aumentar con el inicio del ejercicio es alta ya que se incrementa de 40 a 110 veces en 60 segundos (Gäbel G. 2010) (tabla 1.1.). Los rápidos incrementos en la ventilación, el gasto cardíaco y la hemoglobina permiten al músculo alcanzar rápidamente a sus demandas de O_2 , lo que implica que los procesos dependientes de oxígeno para la producción de energía en el músculo sean capaces de utilizarlo. Sin embargo, el ejercicio intenso en los caballos, particularmente cuando se lleva a cabo en condiciones calientes y húmedas puede conducir al agotamiento de las reservas de energía tales como el glucógeno hepático y muscular (Hyypä y col. 1997), así como pérdidas excesivas de agua y electrolitos (Trigo P. 2010).

Estos cambios afectan la capacidad de ejercicio y resultan en alteraciones cardiorrespiratorias y metabólicas que contribuyen a la fatiga (Hodgson y Rose 1994). Las principales fuentes de producción de energía en el caballo durante el ejercicio son los hidratos de carbono y grasas y, en un grado mucho menor, proteínas (Hiney y Potter 1996). La medida en que se utiliza cada combustible depende de varios factores, incluyendo la intensidad y duración del ejercicio, la disponibilidad de los combustibles, y la influencia de las hormonas (Vervuert I. 2011).

Todas las características antes mencionadas hacen a individuos de la especie equina, atletas capaces de poder saltar vallas de 1.80 metros de altura mezclando potencia y velocidad, correr 2500 metros a una velocidad promedio de

62 kilómetros por hora (17 m/seg) con un jinete de 60 kilogramos sobre sus espaldas, o recorrer distancias de hasta 160 kilómetros a una velocidad promedio de 20 kilómetros por hora (5.5 m/seg), con un jinete que supera los 75 kilogramos, en terrenos totalmente inadecuados y bajo condiciones climáticas desfavorables.

Tabla 1.1. Parámetros fisiológicos seleccionados en el atleta equino y humano (adaptado de Gäbel G. 2010)

Parámetro	Descanso	Ejercicio Intenso	Incremento de la tasa
Equinos			
Frecuencia cardíaca (lpm)	30	210-250	7-8
Volumen Sistólico (L)	1.0	1.7	1.7
Volumen minuto respiratorio (L/min)	30	240-425	8-13
Hemoglobina (g/dl)	13	17-24	1.3-1.6
VO _{2max} (ml O ₂ /kg/min)	2-4	160-220	40-110
Humanos			
Frecuencia cardíaca (lpm)	45	190-200	4.2-4.4
Volumen Sistólico (L)	0.1	0.2	2
Volumen minuto respiratorio (L/min)	4.5	38-40	8-9
VO _{2max} (ml O ₂ /kg/min)	4	50-90	13-23

1.1.2. Metabolismos energéticos

En los mamíferos los músculos comprenden un conjunto de células altamente especializadas que transforman energía química en mecánica como respuesta a acontecimientos excitadores que ocurren en la membrana celular.

Esta característica básica determina que los músculos se contraigan generando tensión y produciendo movimiento, lo que permite al animal realizar actividades tan opuestas como estar parado o correr, así como sustentar la función de los diferentes sistemas orgánicos. Durante el proceso de transformación energética, la energía química que se almacena en los enlaces de las moléculas de los diferentes sustratos metabólicos es transformada en energía mecánica (25%) y gran parte de la energía liberada se pierde en forma de calor o energía térmica (75%). La conversión de la energía química en energía mecánica, de movimiento muscular, requiere la provisión de adenosina trifosfato (ATP) como sustrato. La energía es obtenida principalmente a partir de la degradación del ATP libre, de la fosfocreatina (PCr), de los carbohidratos y las grasas. Estos dos últimos son sustratos que se encuentran tanto dentro como fuera del músculo. Pueden ser aprovechados diferentes sustratos energéticos, algunos de ellos inmediatamente luego de la ingesta de alimentos, mientras que otros son almacenados en el hígado, músculo y tejido adiposo para ser consumidos en otro momento.

La fuente inmediata para que la célula pueda desarrollar actividad está representada por el ATP. La fibra muscular contiene depósitos de alta energía bajo la forma de ATP libre. El ATP se hidroliza gracias a la enzima miosina Ca^{++} y $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, ubicada en las cabezas de miosina para desencadenar el desplazamiento de la actina que da lugar a la contracción. De la hidrólisis de una molécula de ATP se genera Adenosina difosfato (ADP), un grupo fosfato (Pi), y un hidrogenión (H^+), a la vez que se entregan aproximadamente 7 Kcal de energía. Esta energía se utiliza para realizar trabajo muscular, procesos de síntesis metabólicos y otras funciones celulares.



Sin embargo, las reservas de ATP endógenos dentro de los músculos son muy limitadas (~ 22-28 mmol / kg de materia seca) y sólo proporcionan energía durante unos segundos (Hodgson 1985). Para continuar la contracción muscular, el ATP debe ser resintetizado continuamente. La regeneración de ATP se consigue mediante dos vías metabólicas que pueden ser básicamente divididas en Fosforilación Anaeróbica (sin oxígeno) y Fosforilación oxidativa (aeróbica).

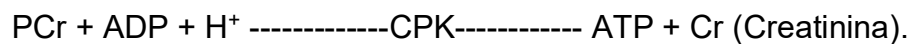
1.1.2.1. Fosforilación anaeróbica

1.1.2.1.1. Fosfatos de Alta Energía

A esta vía metabólica también se la denomina anaeróbica alactácida ya que la degradación de estos sustratos energéticos no consume oxígeno (O₂) ni genera la producción de lactato. Órganos como cerebro, corazón y músculo esquelético contienen además de ATP otro compuesto de alta energía denominado fosfocreatina (PCr), que no intervendría en forma directa como fuente de energía para la actividad muscular, sino que contribuiría a mantener una concentración adecuada de ATP, cuando éste se está utilizando. Bajo condiciones de ejercicio severo los depósitos de ATP y PCr pueden deprimirse en un 50 a 70 %. Estos depósitos son regenerados durante la recuperación pos-ejercicio o durante los ejercicios de baja intensidad, permitiendo a la célula poder volver a utilizarlos en unos pocos minutos (Boffi FM. 2006).

A) Sistema de recambio (Reacción de la fosfocreatina)

Como fue mencionado anteriormente la energía obtenida por los depósitos de ATP libre es escasa y por lo tanto el resto de la energía generada y utilizada en ejercicio de alta intensidad y corta duración es producida por la degradación anaeróbica del PCr. Esta degradación es instantánea al comienzo de los ejercicios de alta intensidad y corta duración, y también al inicio de cualquier actividad física. La degradación de PCr es catalizada por la enzima creatina fosfoquinasa (CPK) que permite la generación de ATP a nivel muscular por un corto período de tiempo (7-10 segundos) (Boffi F.M., 2006).



Las reservas endógenas de fosfocreatina en los músculos están limitados (58-62 mmol / kg de materia seca) y proporcionan sólo una cantidad restringida de ATP (Tabla 3). Se postula que la reacción de la fosfocreatina es de importancia durante las etapas iniciales de ejercicio de alta intensidad y durante el salto (Snow 1991), ya que tiene la particularidad de generar gran cantidad de energía por unidad de tiempo, permitiéndole a la fibra muscular preservar el pool mínimo e indispensable de ATP que toda célula necesita para desarrollar todos sus procesos vitales normalmente. (Vervuert I., 2011)

B) Reacción de la Mioquinasa

Esta reacción se produce cuando la demanda energética del ejercicio supera la capacidad de resíntesis de ATP, como ocurre durante la aceleración o carrera a máxima velocidad, y por lo tanto se acumula una alta concentración de ADP y Pi en el interior de la fibra muscular. En estos casos, se ve alterada la relación ATP/ADP desencadenando la activación de la enzima mioquinasa (MK) que mediante la combinación de dos moléculas de ADP genera una molécula de ATP y una de adenosina monofosfato (AMP) mediante la cesión de un grupo fosfato por parte de una molécula de ADP.



Esta reacción rápida proporciona energía durante el ejercicio intenso y mantiene la relación muscular ATP: ADP principal sensor para la activación de las vías metabólicas (Vervuert I., 2011).

El AMP producido es posteriormente desaminado hacia IMP (inosina monofosfato) y amoníaco, por la acción de la enzima AMP desaminasa (Essén-Gustavsson y col. 1999). La intervención de esta enzima es esencial durante el ejercicio, ya que al mantener concentraciones musculares bajas de AMP, deriva la acción de la MK hacia la producción de ATP. No obstante, se produce una pérdida neta de nucleótidos de adenina (Essén-Gustavsson et al., 1999). El músculo del caballo es muy rico en la enzima AMP desaminasa, en comparación con el humano. Además, se ha visto que esta enzima predomina en las fibras de contracción rápida tipo IIX y se ve activada por la acidosis muscular (Moriwaki y

col. 1999). El IMP formado es degradado a continuación hacia inosina, xantina e hipoxantina en el interior muscular. La hipoxantina es liberada hacia el torrente circulatorio, de modo que los productos finales del metabolismo de las purinas en el caballo son el ácido úrico (AU) y la alantoína (Räsänen y col. 1993).

1.1.2.1.2. Glucólisis Anaeróbica

La segunda vía comprende a la glucólisis anaeróbica o vía glucolítica, que actúa independientemente de las vías oxidativas. La misma utiliza como sustrato los depósitos intracelulares de glucógeno o la glucosa que ingresa a la célula desde el torrente circulatorio por intermedio de transportadores específicos que incluyen GLUT-1 (del inglés "*glucose transporter type 1*") y GLUT- 4 (del inglés "*glucose transporter type 4*"). El GLUT-1 está localizado en el sarcolema y provee los requerimientos basales de glucosa, mientras que los transportadores GLUT- 4 en condiciones baseles se encuentran en el citoplasma y son insensibles a concentraciones basales de insulina y solo se activan en respuesta al pico de insulina o al ejercicio, siendo también sensibles a una serie de estímulos (temperatura, despolarización de membrana) que se dan durante el esfuerzo físico y de esta forma se produce su traslocación hacia la membrana plasmática favoreciendo el movimiento de glucosa desde la sangre al interior de los tejidos. (Rivero, J.L.L, Piercy, R.J. 2008). La producción de energía en forma anaeróbica es esencial para el mantenimiento de los ejercicios de máxima intensidad, cuando la demanda de ATP por unidad de tiempo supera la velocidad con la que puede ser producido en forma aeróbica o bien para suplir la demanda energética hasta que estas vías se encuentren 100% activas. Esta vía metabólica al igual que PCr,

se activa cuando comienza un ejercicio de máxima intensidad o cuando hay un cambio brusco de intensidad en el mismo (Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008).

La glucólisis requiere de la glucosa-6-fosfato como sustrato, que puede derivarse de la fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa o la movilización del glucógeno intracelular almacenado que se metaboliza por la fosforilaza primero a glucosa-1-fosfato a través de la glucogenólisis y luego se convierte en glucosa-6-fosfato. La enzima fosforilasa es activada por el incremento en la concentración del calcio (Ca^{++}) intracelular generado durante la contracción muscular o por el incremento de epinefrina liberada con el inicio del ejercicio, que hace que la fibra muscular disponga de sustrato desde prácticamente el inicio mismo de la actividad física. La enzima hexoquinasa fosforila a la glucosa ingresada desde el torrente circulatorio a glucosa-6-fosfato, con el consiguiente consumo de una molécula de ATP. A partir de glucosa-6-fosfato, esta vía consta de sucesivas reacciones enzimáticas que generan un balance positivo de 2 ó 3 moléculas de ATP, dependiendo si la degradación es de glucosa o glucógeno respectivamente (Clark M.G 1975). La vía glucolítica tiene como enzima paso limitante a la fosfofructoquinasa (PFK) que es estimulada o inhibida, entre otros factores, por la relación ATP- ADP , por la concentración de glucosa-6- fosfato y por el pH (Boffi F.M. 2006). Cuando la concentración de ADP aumenta, la PFK es estimulada y cuando el que aumenta es el ATP, la PFK se inhibe. Esta enzima es paso limitante debido a que la glucosa-6-fosfato puede ser intermediaria de otras vías metabólicas como el ciclo de las pentosas o la conversión a glucógeno. El producto final de esta vía es el piruvato, que dependiendo de su concentración, y de la presencia o no de O_2 y de la concentración de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en la fibra muscular, ingresará a la mitocondria para

continuar con su oxidación, o será transformado a lactato por intermedio de la LDH con el consiguiente acúmulo de lactato e hidrogeniones en el citoplasma de la fibra muscular (vía anaeróbica láctica). La producción de lactato es posiblemente el estadio final de esta vía metabólica (Vervuert I., 2011).

1.1.2.2. Vía aeróbica

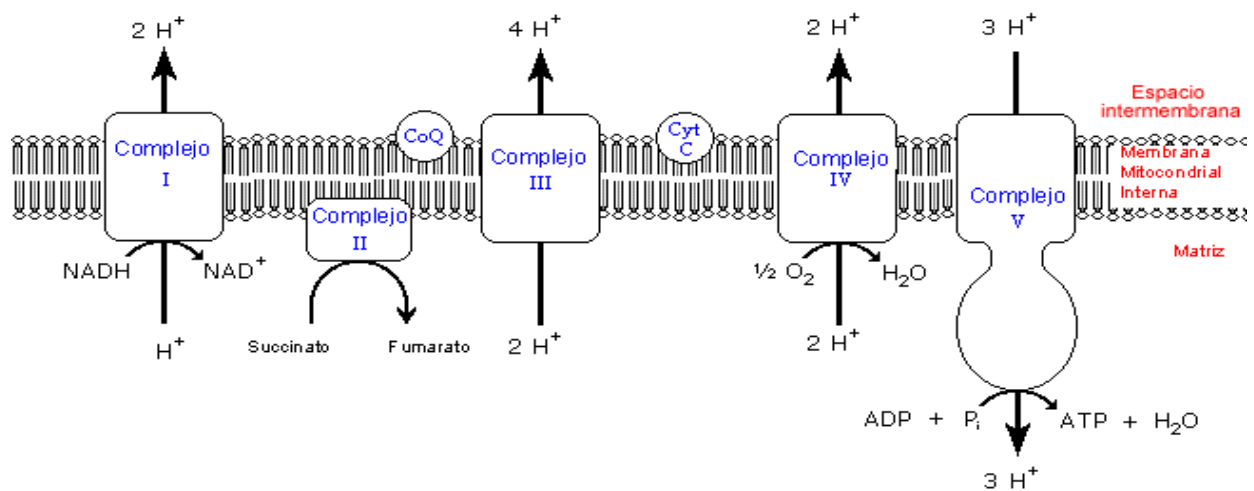
La mayor cantidad de energía generada en las células musculares proviene de la oxidación de los ácidos grasos libres (AGL) y la glucosa, y en menor medida los amino ácidos (aa) como la alanina (Vervuert I., 2011). Dentro de las mitocondrias, la β -oxidación de los ácidos grasos libres, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA del "inglés tricarboxylic acid cycle") o ciclo de Krebs, y la fosforilación oxidativa (a través de la cadena de transporte de electrones) se combinan para producir ATP aeróbicamente. La vía aeróbica necesita de la presencia de O_2 , provisto por la circulación, para poder generar energía mientras que la vía anaeróbica no lo requiere. La reposición de ATP (predominantemente) en fibras musculares oxidativas requiere una fuente fácilmente disponible de oxígeno que es proporcionada por la proteína de unión a hemo- O_2 conocida como mioglobina (Conley K. E y col. 1996). La P_{50} (presión de oxígeno a la que se satura un 50%) para la mioglobina equina es de alrededor de 2,4 mm Hg a temperatura y pH fisiológicos (Schenkman KA 1997; Boffi F.M. 2006, Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008).

1.1.2.2.1. Ciclo de Krebs y cadena de transporte mitocondrial

Específicamente la vía oxidativa es la continuación en la mitocondria de la degradación anaeróbica o citoplasmática a través del ciclo TCA y de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Cuando la relación ATP – ADP se modifica en favor de este último, en presencia de O₂ el piruvato ingresa a la mitocondria y por descarboxilación oxidativa dentro de la misma es convertido a acetil CoA que ingresa al ciclo de TCA. Por lo tanto esta reacción enzimática es la conexión entre la glucólisis y ciclo de TCA, que es el inicio de la fase aeróbica u oxidativa. La regulación del ciclo de TCA está dada por una inhibición alostérica (unión no covalente a un centro distinto del sitio activo de la enzima) del ATP sobre la enzima citrato sintetasa. De esta forma, cuando aumentan las concentraciones de ATP, menor es la cantidad de enzima que se satura con acetil CoA.

El ciclo de Krebs consiste en una serie de reacciones entre las que encontramos condensaciones, oxidaciones y descarboxilaciones oxidativas que generan como producto final 2 moléculas de dióxido de carbono (CO₂), 3 moléculas de dinucleótido de nicotinamida hidrogenado (NADH₂), 1 molécula de dinucleótido de flavina hidrogenado (FADH₂), y una molécula de guanosina trifosfato (GTP) y H₂O. El NAD y el FAD son portadores de electrones desde el ciclo de Krebs hacia la cadena de transporte electrónico mitocondrial, mientras que el guanosina trifosfato (GPT) es un nucleótido de purinas (Krebs H.A., 1970). El NADH₂ y el FADH₂ generados en la glucólisis, ciclo de Krebs y β-oxidación (metabolismo de los ácidos grasos) son ricos en energía porque contienen un par de electrones con un alto potencial de transferencia. La cadena de transporte electrónico o fosforilación oxidativa es el proceso por el cual a partir de la

fosforilación del ADP se forma ATP y agua cuando los electrones se transfieren desde el NADH_2 y FADH_2 al O_2 . Este proceso consta de una serie de reacciones que ocurren en la membrana mitocondrial interna y donde intervienen una serie de portadores de electrones (Hatefi Y. 1985).



Esquema 1.1. Cadena de transporte de electrones mitocondrial. (Adaptado de Marotte C y Zeni SN. 2013).

Durante la degradación de la glucosa o del glucógeno a nivel muscular, la oxidación en la mitocondria es la mayor generadora de moléculas de ATP y da como producto final dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), mientras que las restantes moléculas de ATP se generan por la vía anaeróbica en el citoplasma de la fibra muscular. (Vervuert I., 2011).

Tabla 1.2. Rendimiento energético neto de la degradación de los carbohidratos
(Adaptado de Boffi FM 2006)

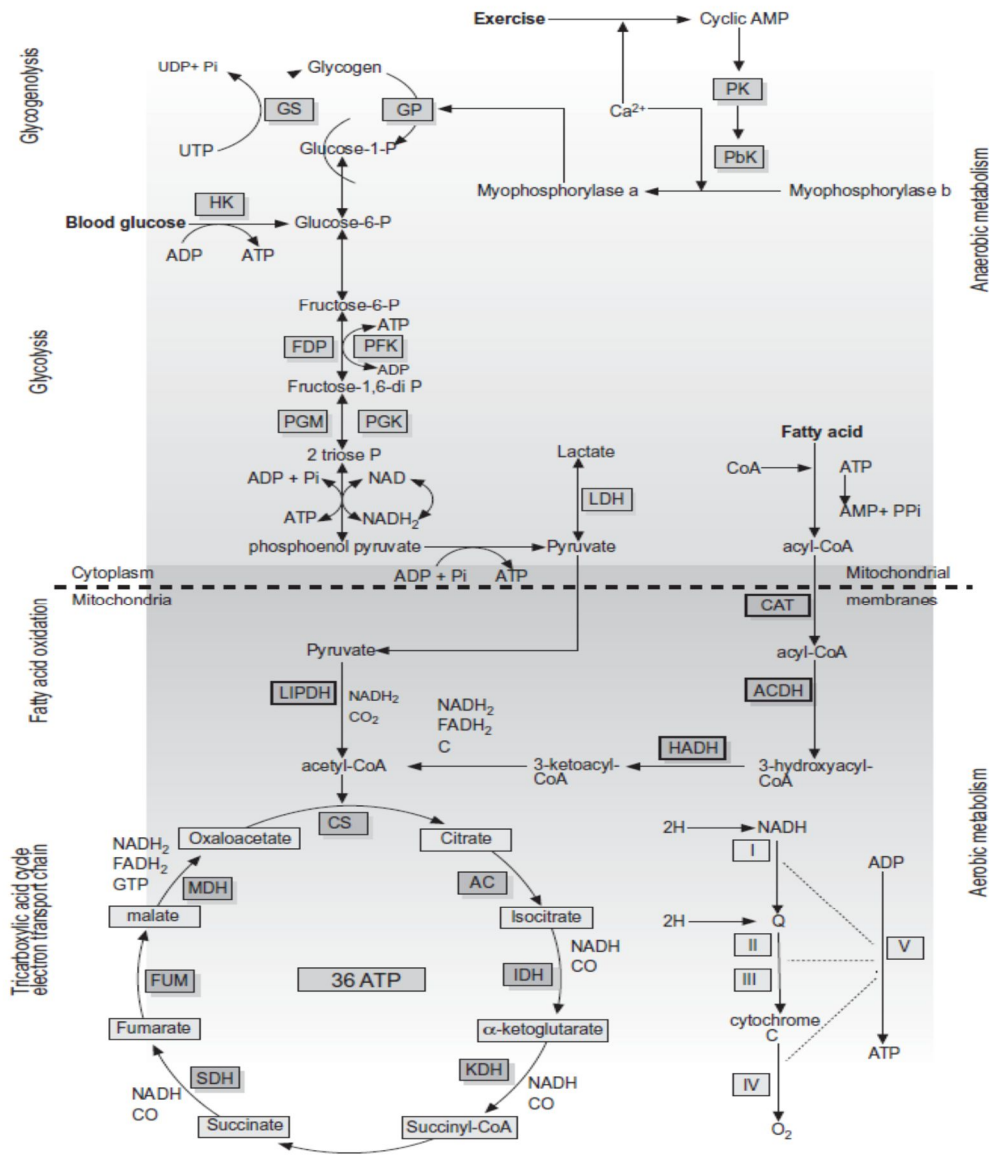
Sustrato	Anaeróbico lactácido	Aeróbico
Glucosa circulante	2 ATP + 2 Lactato + 2 H ⁺	2 ATP + 2 NADH ₂ (c) + 8 NADH ₂ + 2 FADH ₂ + 2 GPT= 36 ATP
Glucógeno almacenado	3 ATP + 2 Lactato + 2 H ⁺	3 ATP + 2 NADH ₂ (c) + 8 NADH ₂ + 2 FADH ₂ + 2 GPT= 37 ATP
Equivalencias Energéticas: 1 NADH ₂ (3 ATP); 1 FADH ₂ (2 ATP); 1 GTP (1 ATP); 1 NADH ₂ (c) (2 ATP por bomba malato aspartato citoplasmática)		

1.1.2.2.2. Oxidación de triglicéridos ó β- oxidación

Los triglicéridos constituyen otra de las fuentes de energía que mediante su oxidación (β- oxidación) pueden ser utilizados en la mitocondria de la fibra muscular (Wakil S.J., Stoops J.K., y Joshi V.C. 1983). Estos depósitos energéticos sólo se encuentran en las fibras musculares oxidativas (Essen-Gustavsson B. 2008). En ejercicios de resistencia (baja intensidad y larga duración) la utilización de ácidos grasos se realiza fundamentalmente a partir de la degradación de triglicéridos almacenados en el tejido celular subcutáneo y en músculo extrafibrilar. Esta movilización lipídica se da como consecuencia de la estimulación de la lipasa hormonosensible a las catecolaminas, presente en los adipocitos. Las catecolaminas incrementan el AMP cíclico, que estimula una proteína quinasa encargada de activar la lipasa por fosforilación. En contraposición el aumento del lactato disminuye la movilización de ácidos grasos libres, incrementando la reesterificación de los mismos sin afectar la lipólisis. Es decir que el lactato es el mayor regulador en la movilización de ácidos grasos

libres durante el ejercicio submáximo de larga duración. La insulina es la hormona inhibitoria de la lipólisis más importante (Boffi FM. 2006). Los triglicéridos por acción de la lipasa son degradados a glicerol y AGL, el glicerol puede ser convertido a piruvato o glucosa en el hígado, y también puede convertirse en gliceraldehído-3-fosfato, que es intermediario en la glucólisis y en la glucogenogénesis. Los AGL son transportados por la albúmina plasmática hacia el tejido muscular (en el caso de los depósitos musculares lo hace por difusión) donde son degradados para la obtención de energía (Wakil S.J., Stoops J.K., y Joshi V.C. 1983).

La β - oxidación consta de 4 reacciones: oxidación, hidratación, oxidación y tiólisis respectivamente, mediante las mismas se logra reducir la cadena de acil CoA en dos átomos de carbono, con la consiguiente generación de FADH_2 , NADH_2 , y Acetil CoA. La cadena de acil CoA así acortada puede volver a ingresar en la β - oxidación. La cantidad total de FADH_2 , NADH_2 u acetil CoA generados por la oxidación de cada ácido graso va a depender de la longitud de la cadena carbonada del mismo. A modo de ejemplo, el ácido palmítico tiene 16 átomos de carbono y genera por β - oxidación $7 \text{ FAD} + 7 \text{ NAD} + 7 \text{ CoA} + 7 \text{ H}_2\text{O}$. El FADH_2 y el NADH_2 generados ingresan a la cadena de transporte electrónico mitocondrial, mientras que el acetil CoA ingresa al ciclo de Krebs de la misma forma en la que lo hacen las moléculas de acetil CoA generadas por la degradación de los carbohidratos. (Boffi FM. 2006, Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008)



Esquema 1.2. Diagrama que resume la integración de las rutas metabólicas en las células musculares. (Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008)

Abreviaturas: AC: aconitasa; ACDH: acil-CoA deshidrogenasa; ADP: difosfato de adenosina; AMP: monofosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; CAT: carnitina aciltransferasa; CoA: coenzima A; CS: citrato sintetasa; FAD: flavina adenina dinucleótido; FDP: difosfatasa fructosa; FUM: fumarasa; GP: la glucógeno fosforilasa; GS: glucógeno sintetasa; GTP: guanosina trifosfato; HADH: 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa; HK: hexoquinasa; I: complejo I; II: complejo II; III: complejo III; IDH, isocitrato deshidrogenasa; IV: IV complejo; KDH: deshidrogenasa cetoglutarato; LDH: lactato deshidrogenasa; LIPDH: lipoamida deshidrogenasa; MDH: malato deshidrogenasa; NAD: dinucleótido de nicotinamida adenina; PBK: fosforilasa b quinasa; PFK: fosfofructoquinasa; PGK: fosfogliceratoquinasa; PGM, fosfogliceratomutasa; Pi: fosfato; PK: proteína quinasa; PPI: pirofosfato; SDH: succinato deshidrogenasa; V: complejo V; UDP: difosfato de uridina; UTP: uridina trifosfato.

1.1.2.3. Integración de las vías metabólicas durante el ejercicio

El aporte energético durante el ejercicio no deriva de una única vía metabólica sino que, hay una integración muy dinámica de todas las vías energéticas. La producción aeróbica de ATP es un proceso relativamente lento, pero altamente eficiente, mientras que las vías anaeróbicas producen energía rápidamente, pero relativamente ineficiente. Aunque ambas vías son generalmente activas durante el ejercicio, la contribución relativa dentro de cada músculo depende de la naturaleza, del nivel de intensidad y la duración de la actividad, de la composición del músculo-tipo de fibra, de la disponibilidad de oxígeno y sustratos, y de las concentraciones relativas de metabolitos intermedios que potencialmente pueden activar o inhibir enzimas seleccionadas. Por lo tanto, durante el ejercicio de baja velocidad cuando el oxígeno es abundante, la producción de energía depende en gran medida del metabolismo del glucógeno a través de vías aeróbicas (Valberg S.J. 1996; Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008). Al cabo de unos minutos, las concentraciones de glucosa y AGL aumentan en la sangre y, luego de una disminución del 20-30% de glucógeno, se produce una desviación hacia la β -oxidación de los AGL (Davie A.J., y col. 1999). Con la mayor demanda de energía, la relación ATP/ADP en el músculo disminuye, lo cual brinda el principal estímulo para la producción de energía mediante los metabolismos anaerobios. La actividad de la fosfofructoquinasa, principal enzima glucolítica reguladora, aumenta ocasionando una mayor producción de piruvato por glucólisis. El momento en el cual se alcanza la VO_{2max} la disponibilidad de O_2 dentro de la célula se convierte en un factor limitante en la fosforilación oxidativa y se refleja en la reoxidación parcial del $NADH_2$, cuando un volumen cada vez

mayor de piruvato se convierte en lactato. A medida que aumenta la intensidad del ejercicio, la vía anaerobia suministra una mayor proporción de energía. El punto en el cual la concentración de lactato alcanza un valor de 4mmol/l se denomina umbral anaerobio. Dicho umbral varía y depende de varios factores, incluyendo la composición del tipo de fibra muscular y el nivel del estado físico (Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008). Asimismo, la dieta tiene una función complementaria; por ejemplo una dieta con alto contenido graso fomenta la producción de energía oxidativa a través de los AGL (Orme C.E. 1997).

Tabla 1.3. Utilización de sustratos y el resultado de la producción de ATP durante el ejercicio (Vervuert I. 2011).

Fuente de energía	Sustrato	Vía Metabólica	Resultado ATP/mol	
Respuesta inmediata al ejercicio				
Músculo	ATP	anaeróbica	1	
	Fosfocreatina	anaeróbica	1	
	Glucógeno	anaeróbica	2	
	Glucosa Sanguínea	anaeróbica	2	
Respuesta lenta al ejercicio				
Músculo	} Glucógeno	aeróbica	36-38	
Hígado				} Glucosa
Sangre				} Amino ácidos
Músculo	} Ácidos Grasos	Aeróbica	~140	
Hígado				} Triglicéridos
Sangre				
Tejido Adiposo				

1.1.3. Propiedades metabólicas de los tipos de fibras musculares

El músculo esquelético en el equino está altamente desarrollado, particularmente en las razas de deporte. En contraste con muchos otros mamíferos donde solo un 30-40 % del peso corporal corresponde al músculo esquelético, o en las razas no atléticas de equinos las cuales poseen un (~42%), en los SPC más de la mitad del peso corporal 55% corresponde a músculo esquelético (Gunn H. M 1987). El flujo sanguíneo muscular total en caballos que ejercitan a un nivel de $VO_{2\max}$ ($VO_{2\max}$ 134 ± 2 ml / min / kg) se ha estimado en 226 l /min, lo que representa aproximadamente el 78% del total del gasto cardíaco (Armstrong R.B. 1992). Durante el ejercicio, metabolitos y oxígeno alcanzan las fibras musculares esqueléticas, y la contracción muscular es el resultado de la transformación de la energía química en energía mecánica. Las fibras musculares muestran significativas diferencias morfológicas, fisiológicas y bioquímicas dentro y entre los músculos.

Estas diferencias constituyen la base para la clasificación de tipos de fibras. Las fibras musculares se han diferenciado bien por histoquímica (reacción de tinción para la miosina ATPasa) en miofibrillas tipo I y tipo II (Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008) ó por inmunohistoquímica, basado en anticuerpos dirigidos contra cadenas pesadas de miosina (Valberg S.J. 2008), en miofibrillas tipo 1, tipo 2a y 2x las que se encuentran más comúnmente en los músculos de las extremidades equinas. Las diferentes propiedades fisiológicas y metabólicas se ilustran en las tablas 1.4 y 1.5.

Tabla 1.4. Propiedades metabólicas de los tipos de fibras musculares en caballos. (diferenciación Inmunohistoquímica, adaptado de Valberg S.J. 2008)

	Tipo 1	Tipo 2^a	Tipo 2x
Velocidad de contracción	Lenta	Intermedia	Rápida
Resistencia a la Fatiga	Alta	Intermedia	Baja
Capacidad Oxidativa	Alta	Intermedia	Baja
Contenido de grasa	Alta	Intermedia	Baja
Capacidad Glucolítica	Baja	Alta	Alta
Contenido de Glucógeno	Baja	Alta	Alta

Tabla 1.5. Propiedades metabólicas de los tipos de fibras musculares en caballos. (diferenciación Histoquímica, adaptado de Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008)

	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIAx	Tipo IIAx	Tipo IIX
Velocidad de contracción	Lenta	Rápida	Intermedia	Intermedia	Muy rápida
Resistencia a la Fatiga	Alta	Intermedia	Intermedia	Intermedia	Baja
Capacidad Oxidativa	Alta	Alta a Intermedia	Intermedia	Intermedia	Baja
Contenido de grasa	Alto	Intermedia	—	—	—
Capacidad Glucolítica	Relativamente Baja	Alta	Intermedia	Intermedia	Alta
Contenido de Glucógeno	Relativamente Baja	Alta	—	—	Alta

La composición del tipo de fibra varía extremadamente entre los músculos, dependiendo en gran medida de la función. Por ejemplo, la musculatura de la extremidad anterior consta de fibras de tipo I postural, mientras que los músculos de propulsión de los miembros posteriores contienen una alta proporción de fibras tipo II de contracción rápida (Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008).

Además, el rendimiento está altamente correlacionado con las características musculares seleccionadas. La capacidad de resistencia está vinculada a altos porcentajes de fibras tipo I y IIA, y altas actividades de las enzimas oxidativas, mientras que la capacidad de sprint se relaciona con un alto porcentaje de fibras tipo II (Essen-Gustavsson 2008, Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008).

1.1.4. Enzimas Musculares:

En los equinos las tres enzimas musculares más utilizadas para evaluar la actividad muscular, y diagnosticar algún tipo de miopatía son la creatina fosfoquinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato aminotransferasa (AST). (Trigo P. 2010).

La CPK es una enzima citoplasmática y posee tres isoenzimas, la CPK1 que se encuentra en el cerebro, nervios periféricos y líquido cefalorraquídeo, la misma no difunde hacia la circulación general. La isoenzima CPK2 se encuentra en el citoplasma de las fibras musculares miocárdicas y la CPK3 se ubica tanto en las fibras miocárdicas como en las fibras musculares esqueléticas, siendo esta última la de mayor especificidad de las tres para el diagnóstico de daño muscular. La CPK es una proteína de un peso molecular relativamente bajo (80.000 D), la

cual es liberada en las primeras horas luego de producida la lesión muscular (Valberg y col. 1993), su pico máximo en plasma se produce entre las 4-6 hs. luego de producido el daño muscular (Figura 1.1.). Si el daño no continúa activo su actividad declina entre las 12 hs de producido el mismo (Piercy, R.J. y Rivero, J.L.L. 2007).

La enzima AST se sitúa, tanto a nivel citosólico ASTc como mitocondrial ASTm y carece de la especificidad tisular de la enzima CPK. La AST muestra actividad elevada en músculo esquelético, cardíaco, hígado y eritrocitos. Su actividad plasmática se incrementa a las 12-24 hs. tras una lesión muscular (Siciliano y col. 1995, Piercy, R.J. y Rivero, J.L.L. 2007). Persiste desde varios días a semanas (Siciliano y col. 1995; Piercy, R.J. y Rivero, J.L.L. 2007). Aunque ambas actividades se elevan en proporción al grado del daño muscular, no siempre reflejan la intensidad, según la evaluación clínica o el pronóstico (Piercy, R.J. y Rivero, J.L.L. 2007).

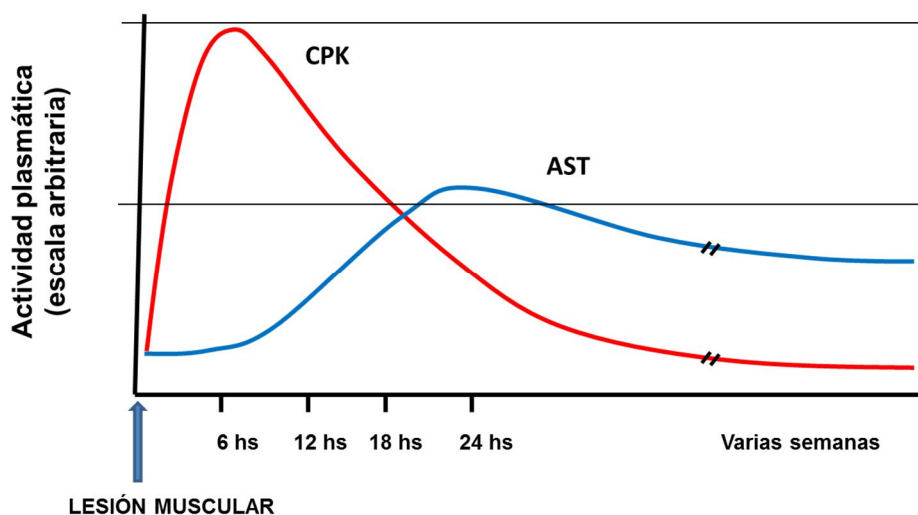


Figura 1.1. Representación diagramática de las alteraciones de las actividades séricas de la CPK y la AST luego de un episodio breve y agudo de rbdomiolisis. (Adaptado de Piercy, R.J. y Rivero, J.L.L. 2007).

Otros marcadores, algunas veces usados en forma experimental para valorar el grado de afectación, como la concentración sérica de mioglobina o las actividades de la aldolasa, la LDH y la anhidrasa carbónica III, ofrecen muy pocas o ninguna ventaja clínica con respecto a las mediciones de CPK y AST (Piercy, R.J. y Rivero, J.L.L. 2007).

1.1.5. Causas de fatiga y daño tisular durante el ejercicio

En deportología la fatiga es el término utilizado para describir las sensaciones de cansancio y la disminución en el rendimiento atlético. La fatiga hace referencia a la imposibilidad de continuar el ejercicio a una intensidad dada (Gómez-Campos R. y col. 2010). En términos generales, cuanto mayor sea la intensidad del ejercicio, antes será la aparición de la fatiga (Marlin D. J.M. 2007) (Figura 1.2.).

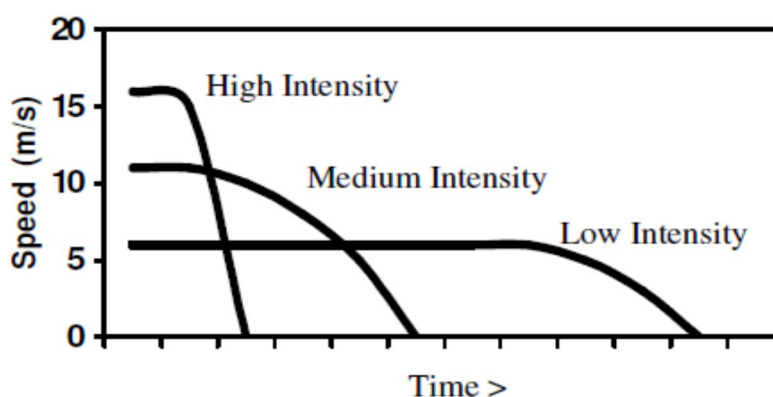


Figura 1.2. Relación entre intensidad, duración del ejercicio y aparición de fatiga. (Marlin D.J.M. 2007).

La fatiga puede ser el resultado del agotamiento de un sistema enzimático, una célula, un órgano o un sistema corporal (Valberg S. J. 1996). Esto a su vez

puede suponer una carga excesiva en otros sistemas del cuerpo, ya que tratan de compensar el déficit de otro. La debilitación de la capacidad de cualquiera de los sistemas corporales de resolver las necesidades de contraer el músculo se expresa eventualmente como fatiga muscular y producción energética disminuida. Como tal, la fatiga del músculo puede ser secundaria a una disfunción primaria en otra parte del cuerpo (Valberg S. J. 1996).

Diferentes áreas han sido estudiadas para tratar de entender los mecanismos de la fatiga: Agotamiento de las reservas de energía como una causa de la fatiga, acumulación de sub productos metabólicos y fracaso del mecanismo contráctil muscular, disturbios en la homeostasis, sistema nervioso central o periférico (Marlin D.J.M. 2007). Las formas de fatiga son frecuentemente resultantes de falencia energética muscular, y varios son los factores que pueden contribuir para la aparición de esta falencia durante el ejercicio físico (Gondim F. J. 2006):

- 1) La intensidad, duración y patrón de ejercicio.(Marlin D.J.M. 2007; Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008)
- 2) Factores individuales como la edad, condición corporal y estado de salud. (Art T. y Lekeux P. 2005).
- 3) Factores medio ambientales (calor, humedad, altitud, contaminación, etc.) (Muriel M. 2006; Trigo P. 2010; Muriel M. 2014)
- 4) La capacidad orgánica en absorber, distribuir y utilizar el oxígeno. (Art T. y Lekeux P. 2005)

- 5) La disponibilidad de suficientes reservas de sustratos energéticos (carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos grasos volátiles) y la capacidad de movilización y utilización de estos sustratos. (Hyypä y col. 1997; Art T. y Lekeux P. 2005; Trigo P. 2010; Vervuert I. 2011)

- 6) La capacidad orgánica de evitar la acidificación (disminución del pH) en el interior de la fibra muscular. (Valberg S. J. 1996; Vervuert I. 2011; Art T. y Lekeux P. 2005)

- 7) La ocurrencia de estrés térmico (elevación excesiva de la temperatura intramuscular), provocando la disminución y/o inactivación de reacciones metabólicas importantes. (Muriel M. 2006; Trigo P. 2010; Muriel M. 2014)

- 8) La ocurrencia de estrés oxidativo (aumento en la formación de radicales libres), alterando tanto la permeabilidad de las membranas celulares como de importantes reacciones metabólicas responsables del mantenimiento de la integridad celular. (Hargreaves y col. 2002a; Kirschvink y col. 2002c; Williams C.A y col. 2005; Williams C.A y col 2012)

- 9) La ocurrencia de estrés mecánico, provocando daños óseos, articulares y musculares, que pudieran provocar mancuernas y períodos de inactividad (Gondim F. J. 2006).

1.1.5.1 Aparición de Fatiga relacionada al patrón de ejercicio

1.1.5.1.1 Ejercicio Submáximo (baja intensidad y larga duración)

La causa de la fatiga durante el ejercicio submáximo difiere de acuerdo a la intensidad del mismo y las condiciones medio ambientales. La fatiga cuando las cargas de trabajo son entre el 65 y el 85% de VO_{2max} ha sido correlacionada al agotamiento intramuscular del glucógeno (Saltin B. y col.1971). Una fuente continua del piruvato es necesaria para metabolizar ácidos grasos libres (FFA) totalmente vía el ciclo de Krebs. Inicialmente, el glucógeno se agota en las fibras musculares tipo 1 y el tipo 2a pero a medida que progresa el ejercicio continúa el agotamiento del glucógeno en todos los tipos de fibras. La repleción del glucógeno ocurre en orden reverso de los tipos de la fibra y la repleción completa puede llevar 72 horas (Valberg S. J. 1996).

En intensidades más bajas del ejercicio, la hipertermia, el agotamiento del líquido y de electrolitos, y la motivación se han sugerido para ser factores primarios en iniciar fatiga (Muriel M. 2006; Trigo P. 2010). Hasta 80% de la energía generada por el metabolismo se pierde como calor (McConanghy F., 1994). La cantidad de calor generada por unidad de tiempo durante el ejercicio máximo es perceptiblemente mayor que la generada en el ejercicio submáximo. Sin embargo, el ejercicio submáximo generalmente se prolonga, y la generación acumulativa del calor puede tener un impacto importante en el funcionamiento. Por ejemplo, el calor generado por un caballo de resistencia que ejercita en el 40% de su VO_{2max} durante 1 hora aumentaría la temperatura del cuerpo en 15°C si no hubiese disipación de calor (McConanghy F., 1994; Muriel M. 2006; Trigo P.

2010). La disipación de calor ocurre principalmente por la evaporación de grandes volúmenes de líquido y de electrolitos a través de la piel bajo la forma de sudor. Bajo condiciones de alta temperatura y humedad, la hipertermia puede influenciar el funcionamiento disminuyendo la función de las enzimas musculares, disminuyendo la fuente de oxígeno y de substratos llevados desde la sangre al músculo esquelético, y alterando el equilibrio de electrolitos a través de las membranas de las células del músculo y del nervio (Marlin D.J.M. 2007).

1.1.5.1.2. Fatiga en ejercicios máximos (alta intensidad y corta duración)

En los ejercicios de alta intensidad y corta duración la principal vía metabólica utilizada es la glucólisis anaeróbica. La glucólisis anaeróbica es rápida pero un proceso ineficiente ya que solo provee dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa metabolizada (Tabla 1.2). El producto final de esta vía metabólica es el piruvato, que dependiendo de su concentración, de la presencia o no de O_2 y de la concentración de la enzima LDH de la fibra muscular, ingresará a la mitocondria para continuar con su oxidación, o será transformado a lactato por intermedio de la LDH con el consiguiente acúmulo de lactato e hidrogeniones en el citoplasma de la fibra muscular (vía anaeróbica láctica) (Rivero J.L.L. y Piercy R.J. 2008). La depleción de las reservas de glucógeno, sin embargo, no es un factor limitante para el ejercicio máximo porque la glucólisis anaeróbica tiende a limitarse a sí misma. El gradual acúmulo de ácido láctico intracelular y la concomitante disminución del pH resulta en una inhibición enzimática con una menor producción de ATP (mecanismo de autorregulación) (Valberg S. J. 1996). Con el ejercicio máximo, los iones libres de hidrógeno y el lactato acumulados,

descienden el pH intramuscular hasta valores de 6,25 – 6,5 (Rivero J.L.L. y Piercy R.J. 2008). La habilidad para remover o tamponar los iones hidrógeno y el lactato desde las células se convierte un fenómeno muy importante. Esto ocurre por la difusión y el transporte activo del lactato en la circulación general y por el tamponamiento (buffering) de los iones de hidrógeno. El tamponamiento dinámico de los iones de hidrógeno es proporcionado por la hidrólisis del fosfocreatina dentro del músculo. El buffering fisicoquímico es proporcionado por las proteínas y los dipéptidos tales como carnosina (Valberg S. J. 1996).

La hipoxemia, el incremento del lactato sanguíneo, y la disminución del pH celular se han sugerido como estímulos posibles para el lanzamiento de enzimas celulares a la circulación (Valberg S. J. y col. 1990, Valberg S. J. y col. 1992). La exposición repetida al ejercicio reduce los niveles de estas enzimas en el plasma, lo cual sugeriría una mayor tolerancia de la membrana celular a los estímulos generados por el ejercicio (Flamino M. J. 1996).

La difusión del lactato y los iones de hidrógeno desde los músculos hacia la sangre ocurre normalmente en una tasa que prevenga su acumulación, y el hígado tiene la capacidad de metabolizarlos, reciclando la energía para ser nuevamente utilizada. Como la tasa de producción aumenta con la intensidad del ejercicio, el lactato y los iones hidrógeno se acumulan y decrece el pH del tejido muscular (Lawrence L.M., 1990). La tolerancia a la acumulación creciente del lactato y al pH bajo de las células del músculo también se desarrolla con el acondicionamiento y la resistencia (Persson S.G.B. y Ulberg L.E.1974; Boffi F.M. y col. 2011). La acidosis muscular puede disminuir la tasa de resíntesis del ATP vía glucólisis durante el ejercicio (Valberg S. J. 1996). El descenso en el pH

intracelular inhibe a la fosfofructoquinasa (PFK), con lo cual se disminuye la producción de ATP por vía glucolítica.

Los caballos no acondicionados al ejercicio de alta intensidad prolongado pueden aumentar la concentración del lactato de la sangre, que puede deteriorar el funcionamiento y la recuperación del ritmo cardíaco (Boffi F.M. y col. 2011). Los caballos bien acondicionados no demuestran generalmente concentraciones sobre el umbral anaerobio (Rose J. R. 1990).

Durante muchos años se creyó que el lactato era un metabolito de desecho de la glucolisis, generado en situaciones de isquemia o durante los ejercicios de máxima intensidad y que era nocivo para la célula. Hoy se sabe que es inocuo para el organismo y que es un importante metabolito intermediario en la gluconeogénesis hepática (Ciclo de Cori), así como también que es utilizado por el músculo cardíaco y por las fibras oxidativas del músculo esquelético como sustrato energético durante la contracción muscular. Los hidrogeniones liberados durante la glucolisis anaeróbica láctica y los generados en la hidrólisis del ATP son los que realmente producen descenso del pH intracelular (acidosis láctica) y son causantes de fatiga. La generación de lactato no solo depende de la disponibilidad de O₂, sino que hay otros varios factores que intervienen, entre los que encontramos la relación ATP/ADP, el tipo de fibra, la velocidad de la glucogenolisis muscular, la dieta, el nivel de entrenamiento y el nivel de catecolaminas circulantes. (Boffi F.M. 2006).

El calcio se requiere para la contracción y la relajación muscular, y también para mantener la concentración del sodio en células nerviosas. Un disturbio en los iones de calcio puede dar lugar a la disfunción del músculo. El descenso en el pH intracelular afecta directamente la fuerza generada por el ciclo cross-bridge

durante la contracción muscular, inhibe los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, y enlentece la recaptación de calcio hacia el interior de mismo por parte de la ATPasa calcio dependiente luego de la contracción muscular. La disminución en la función del retículo sarcoplásmico ha sido reportada en equinos con fatiga luego de un ejercicio máximo (Byrd S.K. y col. 1989). Alteraciones en el sarcolema incrementan la afluencia del calcio y consecuentemente hipercontracción de la fibra muscular, y necrosis de la célula muscular. Paradójicamente, la hipocalcemia permite difusión espontánea de sodio dentro de los nervios, resultando en fasciculaciones y contracciones musculares involuntarias. Algunos caballos con rabdomiolisis intermitente crónica tienen un umbral más bajo para la liberación de calcio (calcio inducida) en fracciones pesadas del retículo sarcoplásmico, sugiriendo la regulación anormal del calcio (Beech J y col. 1993).

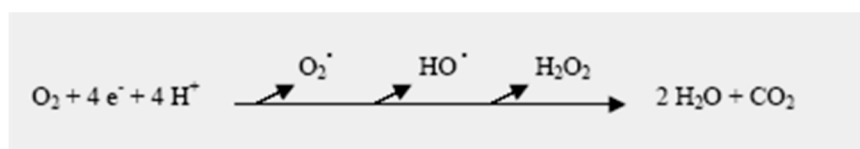
Aun los mecanismos exactos de fatiga no se conocen pero el aumento en la concentración citoplasmática de H^+ y la declinación en el pH asociado con otros factores tales como formación de radicales libres del oxígeno, peroxidación de lípidos, y elevación del calcio intracelular, pueden ser importantes en el proceso (Boffi F.M. 2006; Marlin D.J.M. 2007; Rivero, J.L.L. y Piercy, R.J. 2008).

1.1.6. Radicales libres

Una de las paradojas de la vida en este planeta es el hecho de que la molécula que sustancia la vida aeróbica, el oxígeno (O_2), no solo es fundamental para el metabolismo energético y la respiración, sino que además se halla implicado en numerosas enfermedades y condiciones degenerativas (Marx, J.L. 1985). El O_2 es utilizado como oxidante terminal en la respiración en orden de aprovechar la ventaja energética que posee sobre los procesos de fermentación y demás procesos respiratorios que utilizan otros oxidantes. Sin embargo, la presencia de O_2 intracelular puede derivar inadvertidamente en la ocurrencia de reacciones de óxido-reducción conducidas por radicales del O_2 , capaces de dañar a cualquier biomolécula (Imlay, J.A. y Linn, S. 1986). Este fenómeno ocurre cuando se produce la reducción univalente del O_2 , originando compuestos como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), los cuales son conocidos genéricamente como especie reactivas de oxígeno (ROS) (Moody, C.J. and Hassan, H.M. 1982).

Un radical libre (RL) se puede definir como un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados en su órbita externa, que disminuye su estabilidad y aumenta su reactividad con otras moléculas o átomos. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) han sido definidas como moléculas que contienen oxígeno que es más activo que el oxígeno (tripleto) presente en el aire (Noguchi N. y Niké, E. 1999). Los ROS son especies químicas normalmente producidas durante el metabolismo del O_2 (ver ecuación 1.) que poseen uno o más electrones desapareados, capaces de existir en forma independiente, que se producen en todas las células. La mayoría de los radicales que se producen *in*

vivo son originados tanto a partir de las *especie reactivas de oxígeno* (ROS) como de nitrógeno (RNS) (Ji L. 1996). Durante el metabolismo oxidativo, aproximadamente el 98% del oxígeno consumido forma agua y CO₂, sin embargo, aproximadamente el 1 a 5% del oxígeno no es completamente reducido y en cambio forma ROS (Chance y col. 1979). En los pasos intermedios de la reducción del oxígeno a agua se pueden formar radicales como O₂^{•-}, H₂O₂ y HO[•]. Además, el oxígeno molecular en su estado fundamental, puede ser excitado electrónicamente hacia el oxígeno molecular singlete (¹O₂).



Ecuación 1.1. Metabolismo del oxígeno y formación de ROS.

Cuando el oxígeno se combina con otras moléculas puede formar ROS tales como el alcoxilo (LO[•]), peroxilo (LOO[•]), e hidroperoxilo (LHOO[•]). Otras ROS, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los peróxidos lipídicos, tienen la capacidad de ser convertidos en radicales libres (HO[•]) por metales de transición tanto libres en la célula como unidos a proteínas (Rodríguez Perón y col. 2001; Marlin D. y col. 2002). Las RNS incluyen los radicales libres óxido nítrico (NO[•]), dióxido de nitrógeno (NO₂[•]) y el potente oxidante peroxinitrito (ONOO⁻) (Ji L. 1996).

Los radicales libres tienen el potencial de reaccionar con una variedad de especies químicas, ya que participan en un amplio rango de funciones biológicas en la señalización celular (ej. NO[•]) y en la enzimología (ej. el rol de los radicales libres unidos a proteínas en el mecanismo de una variedad de reductasas,

peroxidasas, catalasas y oxidasas). Las ROS también se producen inadvertidamente en el cuerpo, mediante una variedad de mecanismos. La mayoría de los radicales libres producidos *in vivo* son oxidantes, capaces de oxidar una gama de moléculas biológicas, incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos (Ji L. 1996). Dentro de este contexto, se asume actualmente que una cantidad controlada de ROS, especialmente de $O_2^{\bullet-}$, no solo no son deletéreas, sino que son útiles para el normal funcionamiento de células y tejidos (Droge, W. 2002), como lo demuestran diferentes experiencias en las que las ROS estimulan la producción de la Guanilato ciclasa y la formación del segundo mensajero GMPc (Mittal, C.K.; Murad, F. 1977), el incremento en la producción de IL-2 en células T activadas (Roth, S.; Dröge, W. 1987), la expresión del gen de la Hemo-oxigenasa (Keyse, S.M.; Tyrrell, R.M. 1989) o la expresión del factor nuclear de transcripción NF- κ B (Schreck, R.; Baeuerle, P.A. 1991). No todos los radicales son inestables y el tocoferoxil y el radical dihidroascorbato son ejemplos de radicales estables (Marlin D. y col. 2002). La presencia de ROS en el cuerpo es una ocurrencia natural y ellos tienen varios papeles fisiológicos beneficiosos, incluso la síntesis de compuestos biológicamente esenciales, producción de energía y fagocitosis (Marlin D. y col. 2002).

Existe un delicado balance entre los efectos beneficiosos y deletéreos de las ROS, y esto es un aspecto importante para la vida (Droge, W. 2002). Las ROS existen en los organismos en baja concentración (Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. 1989) y condicionan el estado "prooxidante" celular. Su concentración es determinada por el balance entre su tasa de producción y de eliminación. La tasa de eliminación depende de la acción de compuestos antioxidantes, los cuales son definidos por Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1989) como sustancias que en

bajas concentraciones son capaces de competir por los sustratos oxidables, disminuyendo o inhibiendo la oxidación de estos. De todos modos, una pequeña fracción de estos es capaz de provocar daño aún en condiciones antioxidantes óptimas (Adelman, R. y col. 1988) esto se deduce al encontrar metabolitos de la oxidación de bases nitrogenadas en la orina de individuos normales, lo cual ha sido considerado como la consecuencia de la permanente oxidación del ADN derivada del flujo fisiológico de ROS (Joenje, H. 1989; Drogue, W. 2002).

1.1.6.1 Estrés oxidativo y Daño oxidativo:

Las defensas antioxidantes existentes en el cuerpo son suficientes y adecuadas para prevenir un daño sustancial a los tejidos, sin embargo, no hay un exceso de estas sustancias, y una sobreproducción de radicales libres o una caída en el nivel de las defensas antioxidantes conducirá a un desbalance (Drogue, W. 2002) (ver figuras 3, 4, 5 y 6), situación conocida como *Estrés Oxidativo* (EO) (Sen, C. 1995). Teniendo como consecuencia la producción de daño oxidativo, el cual puede afectar a macromoléculas biológicas como los lípidos de membrana, las proteínas y el ADN (Joenje, H. 1989). El aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno que conduce a estrés oxidativo celular está vinculado a numerosas patologías, incluyendo cáncer, diabetes, y enfermedades neurológicas (Valko, M. y col. 2006; Reddy, V. P y col. 2009). La presencia de estrés oxidativo no implica automáticamente el daño oxidativo. Esta última sólo puede ser verificada mediante la medición directa de marcadores de daño oxidativo. La peroxidación lipídica es por lejos el biomarcador de daño

oxidativo más extensamente estudiado después del ejercicio (Parker L. 1997; Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003).

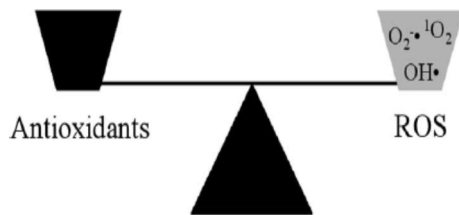


Figura 1.3. En condiciones normales de reposo y en individuos sanos hay una producción normal de fondo de ROS, pero estos son adecuadamente "amortiguados" por los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de manera que hay un equilibrio entre la producción y la eliminación. Esto también implica que los antioxidantes oxidados se regeneran (es decir, reducen) para mantener el ritmo de la producción de ROS. (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003)

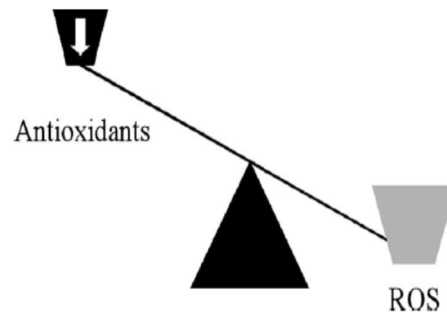


Figura 1.4. El estrés oxidativo puede ocurrir sin ningún aumento en la producción de fondo normal de ROS debido a la reducción selectiva o general de los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003)

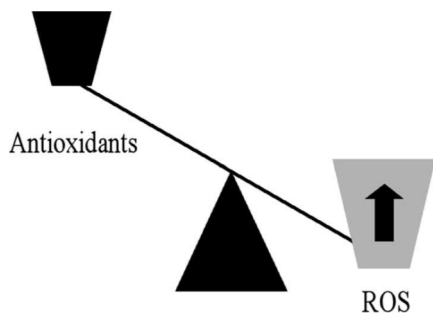


Figura 1.5. A pesar de una capacidad antioxidante adecuada (enzimática y no enzimática), un marcado incremento en la producción de ROS puede sobrecargar el sistema antioxidante, es decir, el desarrollo del estrés oxidativo. (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003)

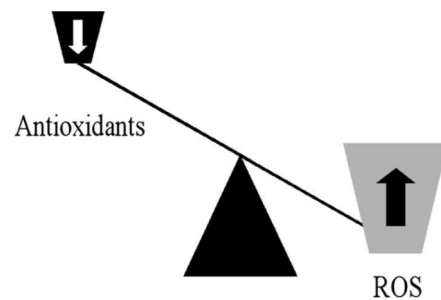


Figura 1.6. El peor de los casos es cuando hay a la vez una reducción de la capacidad antioxidante combinada con el aumento de la producción de ROS. Esto puede suceder en ciertas enfermedades como el asma humana u obstrucción recurrente equina (RAO). La enfermedad causa la reducción crónica en las defensas antioxidantes y también se incrementa la producción de ROS de forma espectacular en las exacerbaciones de la misma. (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003)

1.1.6.2. Daño molecular inducido por especies reactivas de oxígeno

En 1954 una investigadora argentina, *Rebeca Gerschman*, sugirió por primera vez que los RL eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades (Gerschman R. 1954). Las ROS actúan por abstracción de electrones a partir de residuos de las macromoléculas orgánicas e inician una cadena de reacciones que resultan en daño a una considerable distancia de donde ocurrió el evento inicial (Friedberg, E.C. y col. 1995). El fenómeno de oxidación del sustrato orgánico ocurre o bien por la sustracción de átomos de hidrógeno, o bien por la incorporación de un HO• al sustrato. Si bien todas las ROS son capaces de reaccionar con los sustratos, dos fenómenos determinan el potencial o peligrosidad de cada uno de los tipos. Así, el O₂^{•-} por sí mismo parece poco probable que sea capaz de infligir graves daños, estando ligada su peligrosidad a su capacidad de dismutarse para generar H₂O₂ y a su capacidad de difundir a través de las membranas celulares (Joenje, H. 1989, Picco S. 2004). El H₂O₂, al igual que el anterior, posee escasa reactividad propia, pero en presencia de metales de transición es capaz de generar al poderoso HO• (Joenje, H. 1989), siendo además el que posee la mayor tasa de difusión, penetrando fácilmente en el núcleo celular. Finalmente, el HO•, si bien posee una baja tasa de difusión y una vida media corta, tiene un alto poder de reacción con la materia orgánica (Joenje, H. 1989) y ha sido señalado como el responsable del daño en el ADN (Friedberg, E.C. y col. 1995; Kasprzak, K. 2002).

Los RL reaccionan con diferentes macromoléculas del organismo, causando de esta forma daños celulares que en algunos casos pueden llegar a ser irreversibles y provocan la muerte celular (Sen, C. 1995). Ambas especies

reactivas ROS y RNS son capaces de alterar macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas y ADN (Gandhi G. y Gunjan 2009).

Daño sobre lípidos: Los radicales libres atacan lípidos muy fácilmente por atacar a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), presentes en la membrana celular, por peroxidación de lípidos (destrucción oxidativa de PUFAs) (Dillard y col. 1978). Esta peroxidación cuenta con una fase de iniciación, propagación y terminación las cuales se detallan más abajo. Los ácidos grasos poliinsaturados más afectados son el linoléico y el araquidónico. Como consecuencia de la peroxidación se generan aldehídos activos que inactivan muchas estructuras y compuestos celulares como las membranas y enzimas. Estos aldehídos tóxicos liberados al final de la reacción son peligrosos para los componentes celulares incluyendo DNA, debido a que forman aductos covalentes de ADN-aldehído (Suresh y Tiwary 1999).

Daño sobre proteínas: Los aminoácidos (aa) que forman las proteínas y péptidos son blanco de los radicales libres y producen cambios físicos como fragmentación, agregación y susceptibilidad a la digestión proteica (Avellini L. y col. 1999). Las ROS inducen alteraciones significativas en las proteínas que presentan aa con grupos sulfhidrilo susceptibles, y conducen a la fragmentación de las mismas y los enlaces cruzados (Devasagayam and Kamat 2000). Los aa más susceptibles son: prolina, histidina y arginina (G. Gandhi y Gunjan 2009).

Daño sobre ADN: Los radicales libres producen la fragmentación del ADN (Moller P. y col. 2001). En los seres humanos, hay 1.5×10^5 aductos oxidativos

por célula y esto corresponde a aproximadamente 0,005% del número total de nucleótidos que componen el genoma humano (Burdon 1999). El daño oxidativo en el ADN inducido por ROS produce roturas de simple y doble cadena, alteraciones de bases, daños a la desoxirribosa, formación de enlaces cruzados en las proteínas de ADN, etc (Hartmann y Niess 1999). De acuerdo al grado de fragmentación, el ADN puede o no ser reparado. La principal secuela es la mutación que en ocasiones desencadena diferentes procesos carcinogénicos (Boffi F. M. 2006).

1.1.6.3. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Si bien el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas, el estrés oxidativo en organismos superiores se produce casi exclusivamente por especies cuya formación es endógena. Los radicales libres se producen por alteraciones accidentales en el transporte o utilización del oxígeno, o bien de forma intencionada o específica, por acción enzimática direccionada.

Las ROS son producidas normalmente durante el metabolismo celular. Las dos principales fuentes de producción son las mitocondrias y las células fagocíticas, las primeras durante el metabolismo oxidativo mitocondrial, mayoritariamente a nivel de ubiquinona-citocromo b de la cadena transportadora de electrones y las segundas durante el estallido respiratorio (Oldham, K.M.; Bowen, P.E. 1998). Además, numerosas enzimas mitocondriales, citoplasmáticas y peroxisomales producen diferentes proporciones y tipos de ROS, ya sea como metabolitos intermedios dentro de una cadena de reacciones, o bien como metabolitos terminales (Joenje, H. 1989).

Cadena transportadora de electrones mitocondrial: La mitocondria es una de las principales fuentes de ROS. Como se mencionó anteriormente el 1 a 5% del oxígeno es incompletamente reducido y forma ROS (Ji L. 1996; Mills P.C. y col. 1997; Williams y col. 2004; Kinnunen S. y col. 2005). En el músculo en ejercicio, la energía química se convierte en energía mecánica y esta energía proviene del ATP (que está limitado en las células y tiene que ser regenerado). La vía más eficaz de regeneración de ATP es a través de la oxidación de glucógeno y la grasa almacenada en la musculatura. El oxígeno molecular es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria situada en las mitocondrias. Por lo tanto, las mitocondrias representan sitios potenciales para la elevada formación de ROS durante el ejercicio exhaustivo (Gandhi G y col. 2009). El consumo de oxígeno puede aumentar varias veces con el ejercicio como se mencionó anteriormente. En reposo el VO_2 de un caballo Sangre Pura de Carreras es de aproximadamente 5 ml/min/kg de peso corporal (Bulter P. J. 1993) en comparación con un $\text{VO}_{2 \text{ max}}$ de entre 110 y 220 ml/min/kg durante el ejercicio máximo (Kinding C.A. y col. 2001). Por otro lado el consumo de oxígeno de las fibras musculares individuales puede ser aún mayor debido a aumentos tanto en el flujo de sangre y la diferencia arterio-venosa (Lykkesfeldt J. y col. 1995). La fuga de electrones desde la cadena de transferencia de electrones mitocondrial resulta en la producción de aniones superóxido. La producción de radicales libres medida por ESR (electron spin resonance spectroscopy) se correlaciona fuertemente con el consumo máximo de oxígeno (Ashton T. y col. 1998). De esta forma el ejercicio incrementa la producción de ROS mitocondrial basado en el hecho de que el VO_2 se incrementa dramáticamente durante el ejercicio extenuante (Deaton C.M. y Marlin D.J. 2003; Williams C.A. y col. 2005). La producción mitocondrial de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), se

produce mediante reacciones secundarias de los radicales flavina o ubisemiquinona (UQH-) con el oxígeno:



En la ubiquinona citocromo b de la cadena de transporte electrónico se produce la mayor producción del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ por oxidación de la ubisemiquinona y por la actividad de la enzima NADH deshidrogenasa. La mayor parte del $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado en la mitocondria se convierte en H_2O_2 por acción de la enzima manganeso superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD), pero algo escapa a la acción de esta enzima y difunde al citoplasma como radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ (ver figura 1.7.) (Marotte C. y Zeni S.N. 2013). Las membranas de los microsomas y del núcleo también tienen sistema de transporte electrónico, citocromo P450 y b5 que, tal vez, también generen radicales libres. La enzima xantina oxidasa produce radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ al reducir el citocromo C.

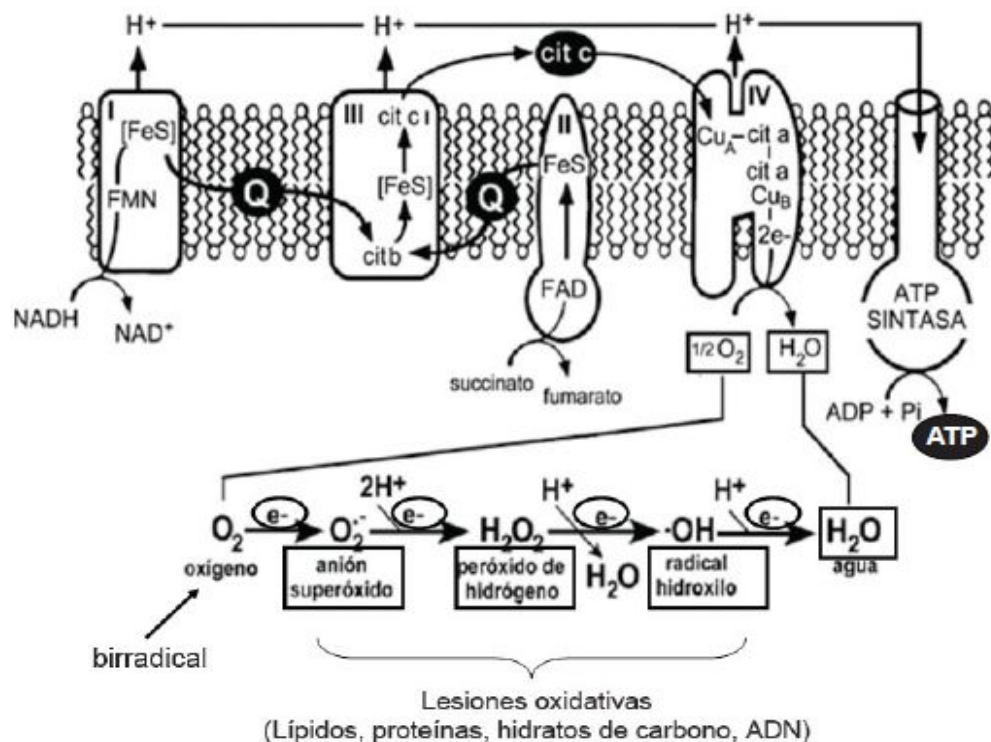


Figura 1.7. Transporte mitocondrial como generador de ROS. (Marotte C. y Zeni S.N. 2013)

Se ha determinado que la mitocondria también genera $\text{NO}\cdot$, que formaría parte de la producción total de radicales libres durante el ejercicio. Cuando el $\text{NO}\cdot$ reacciona con O_2 forma peroxinitrito (ONOO^-), un poderoso oxidante. Se cree que esta reacción representa la principal vía para generar especies reactivas de nitrógeno (Leeuwenburgh, C. y col. 2001).

Oxidación del Hierro y grupos hemo: El otro mecanismo que involucra alteraciones accidentales en el transporte o utilización del oxígeno esta constituido por el hierro y el grupo hemo de la hemoglobina (Hb) y la mioglobina (Mb) (Leeuwenburgh C. y col. 2001), sin embargo el inicio de esta vía está asociada con los ROS que se liberan a partir de leucocitos activados, situación que se presenta en el ejercicio exhaustivo y en la hipoxia (Gohil K y col. 1988).

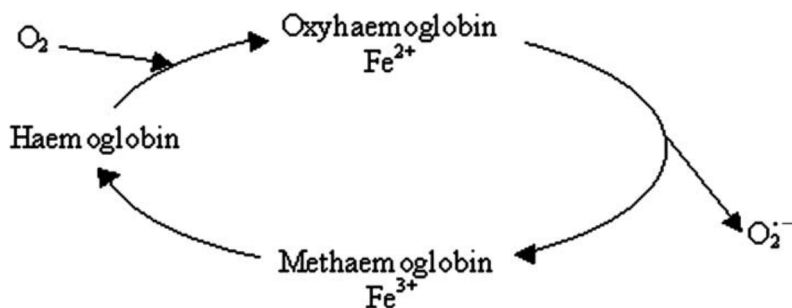


Figura 1.8. Generación de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) durante la oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina. (Gohil K y col. 1988).

Procesos dependientes de la fosfolipasa - A2: La fosfolipasa A2 (PLA2) es una enzima que escinde los fosfolípidos de la membrana para liberar ácido araquidónico, que es un sustrato para los sistemas enzimáticos generadores de ROS tales como las lipoxigenasas (Zuo L. y col. 2004). Además, la activación de

PLA2 puede activar NADPH oxidasas (Zhao X. y col. 2002) y el aumento de la actividad PLA2 puede estimular la producción de ROS en la mitocondria del músculo (Nethery, D. 2000) y el citosol (Gong, M. C. 2006), y la liberación de ROS en el espacio extracelular (Zuo, L. y col. 2004). Ambas formas de PLA2 dependiente e independiente de calcio existen en el músculo esquelético y ambas podrían contribuir a la generación de ROS muscular (Powers, S. K. y Jackson, M. J. 2008). En este sentido, la actividad de las enzimas calcio independiente citosólica se predice para modular la actividad oxidante en células del músculo esquelético (Gong, M. C. 2006), mientras que una isoforma dependiente de calcio de 14-kDa que se encuentra dentro de la mitocondria ha sido reportada para estimular la generación de ROS mitocondrial durante la actividad contráctil (Nethery, D. y col. 1999). Gong y colaboradores en 2006 postularon la hipótesis de que la PLA2 independiente del calcio fue un importante factor determinante de la actividad ROS en condiciones de reposo, mientras que durante las contracciones, el estrés por calor, u otros procesos de elevación calcio intracelular, la PLA2 dependiente de calcio se activa para promover la producción de ROS.

Mecanismo de isquemia-reperfusión: Durante el ejercicio el flujo de sangre está restringido en algunas áreas (riñones y región esplácnica) y se desvía a los músculos activos. Esta distribución selectiva de oxígeno y nutrientes produce un estado de hipoxia transitoria en las zonas restringidas, que está directamente relacionada con la magnitud del ejercicio (Adams y Best 2002). Además de esto, las fibras musculares sufren hipoxia relativa durante el ejercicio realizado a intensidades por encima del consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}), ya que el

suministro de O_2 no puede satisfacer las necesidades de energía. La reoxigenación de estos tejidos (pago de la deuda de O_2) se produce después de la cesación de ejercicio - completando el ciclo de isquemia-reperfusión con la generación subsiguiente de ROS. Además, la perfusión conduce a un aumento de la generación de ROS mediante la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa (Ji 1999).

Reacciones catalizadas por xantina oxidasa: Dentro de los mecanismos enzimáticos, tal vez el más importante sea la vía de la xantina oxidasa (XO), que contribuye a la generación de H_2O_2 en tejidos con concentraciones elevadas de xantina e hipoxantina (Simpson P. y col. 1987). Esta vía involucra un sistema de mutación o conversión de la xantina deshidrogenasa (XDH) en XO. Tanto la XDH como la XO catalizan la degradación de la hipoxantina (HX) en xantina (X), y subsecuentemente en urato. La XDH oxida la hipoxantina a xantina y xantina a ácido úrico utilizando NAD como aceptor de electrones formando NADH. Esto sucede también después de eventos de isquemia-reperfusión en órganos como el corazón. La enzima XDH predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del Ca^{++} , etc) y genera O_2^- (Rodríguez Perón y col. 2001). Durante el ejercicio intenso, las fibras de los músculos en actividad pueden sufrir hipoxia (Packer L. 1997). Durante la isquemia, debido a la demanda de energía para la contracción, el ATP se degrada a ADP y este en AMP por la MK. El AMP es continuamente degradado mediante la vía de las inosinas hasta HX, que se convierte en X y ácido úrico por XO junto con la reducción de un electrón de O_2 , dando lugar a O_2^- , esto si el suministro de O_2 es insuficiente. Después de una intensa contracción muscular se acumula HX; la concentración

de ácido úrico aumenta tanto en el músculo como en el plasma, lo que sugiere una activación de XO (Hellesten y col. 1993). Durante la reperfusión, con el consiguiente aumento en la carga de oxígeno, la XO todavía convierte HX en ácido úrico, pero utiliza oxígeno como aceptor de electrones formando superóxido. Es así que, sólo XO produce $O_2^{\cdot-}$ en el último paso de esta reacción (Insua M. F. 2003).

La producción de ROS vía este mecanismo conduce a estrés oxidativo varias horas después del ejercicio, y no está restringido al músculo esquelético. Interesantemente Viña J. y col. (2000) observaron que, radicales libres marcadores de estrés oxidativo, se redujeron significativamente en animales y humanos luego de la adición de alopurinol, un inhibidor de la XO. La xantina oxidasa podría ser más importante que la mitocondria como fuente de radicales libres producidos por el ejercicio (Insua M. F. 2003).

Mecanismo inflamatorio: La otra fuente enzimática de importancia son los polimorfonucleares (PMN). Cuando se activan los PMN neutrófilos (*respiratory burst*) liberan $O_2^{\cdot-}$ (Oldham, K.M.; Bowen, P.E. 1998). Por tanto, si existe lesión tisular causada por el ejercicio intenso, la activación subsiguiente de los neutrófilos se convierte en una fuente de ROS (Ji L. 1996). Estas células activadas pueden causar peroxidación lipídica en células vecinas, como los eritrocitos, debido a que sus productos son capaces de atravesar la membrana celular y producir oxidación de la Hb, para dar inicio al proceso de hemólisis (Weiss S. 1980). Debido a que la infiltración por neutrófilos en los tejidos lesionados por el ejercicio es secundaria a la producción y liberación de proinflamatorios, esta vía quizá no es la primera fuente de producción de ROS

durante el ejercicio. Sin embargo, sí puede servir como una fuente de importancia durante el período de recuperación después de un ejercicio agotador (Kuo C. y col. 2005).

Existen otras vías de menor importancia como son los peroxisomas o las catecolaminas, que si bien no se ha cuantificado su contribución a los radicales libres, su importancia parece ser mucho menor (Ji L. 1996).

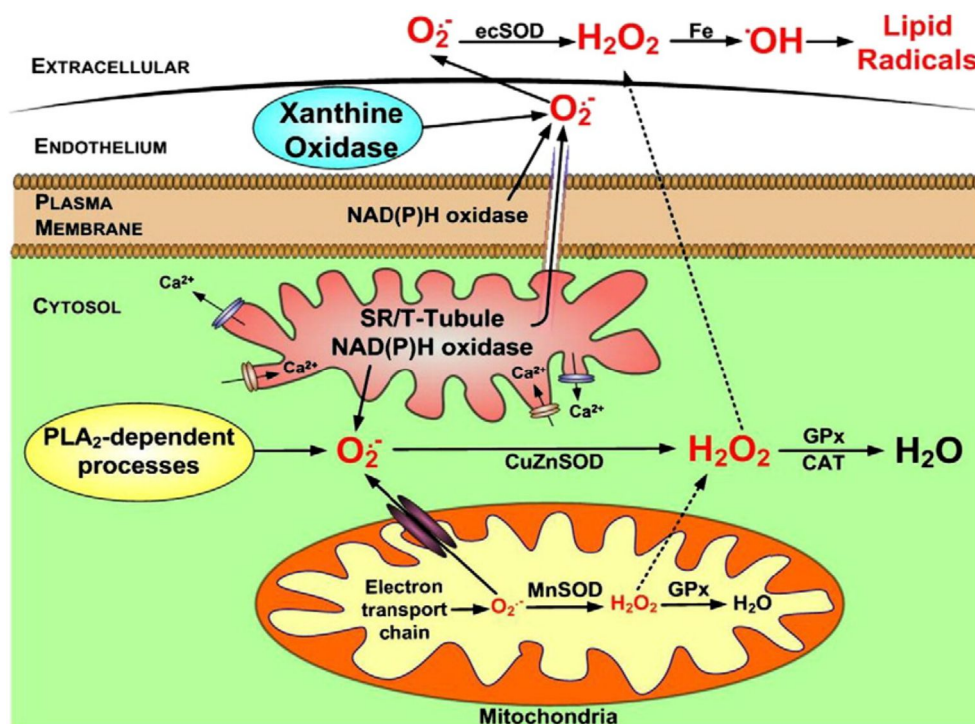


Figura 1.9. Ilustración de los sitios seleccionados en las fibras musculares esqueléticas que son capaces de producir especies reactivas del oxígeno. (Adaptado de Scott K. Powers y col. 2011). SR/T-tubule: retículo sarcoplásmico / túbulo transversal; PLA2: fosfolipasa A2; ecSOD: superóxido dismutasa extracelular; MnSOD: manganeso superóxido dismutasa; GPx. glutatión peroxidasa; CAT: catalasa.

1.1.6.4. Estrés oxidativo como causa de daño durante o después del ejercicio

El ejercicio se considera como una condición de generación excesiva de ROS, que resulta asimismo en respuestas compensatorias por parte de los sistemas antioxidantes (Vollaard N y col. 2006), y aunque los mecanismos de su generación no están completamente claros, algunas de sus posibles fuentes incluyen: 1) procesos de isquemia reperusión; 2) oxidación de hemoglobina y mioglobina; 3) formación programada por las células del sistema inmune y 4) formación durante el metabolismo oxidativo. Estos mecanismos pueden actuar de forma sinérgica y también es probable que algunos de ellos contribuyan en magnitud diferente según el tipo de ejercicio realizado y su intensidad (Finaud J y col. 2006).

La formación de radicales libres durante el ejercicio depende de la intensidad, frecuencia, duración y tipo de ejercicio. Existe evidencia experimental indicativa de aumento en la producción de ROS, así como de estrés oxidativo y de daño oxidativo tisular asociado con ejercicio sea agudo y exhaustivo (Chevion S. y col. 2003), o moderado (Inayama T. y col. 2000). Altos niveles en el consumo de oxígeno durante ejercicio también han estado implicados como factor que contribuiría al estrés oxidativo en los seres humanos (Kinnunen S. y col. 2005) y animales (Williams C.A. y col. 2005; Kirschvink N y col. 2008).

Hay desbalances homeostáticos relacionados al ejercicio que han sido asociadas al daño por estrés oxidativo. Entre ellos encontramos la fatiga muscular y el daño fibrilar (Powers y Lennon 1999). El músculo esquelético puede ser un sitio primario de lesión del oxidante porque parece tener niveles

comparativamente bajos de antioxidantes (Avellini L. y col. 1999). Se describe al estrés oxidativo como un componente primordial en la generación de hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (Mills y Higgins 1997). Sentürk, Ü. y col. 2001 demostraron alteraciones funcionales y estructurales en los eritrocitos de ratas sedentarias luego de ser sometidas a ejercicio intenso.

En 1982, Davies y col. evidenciaron un aumento en la producción de RL durante el ejercicio físico. El aumento del consumo de oxígeno, cuando se incrementan las cargas de trabajo, determina una mayor actividad oxidativa sobre los componentes del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones, provocando un aumento de la producción de RL, que se estima entre un 1-5% del oxígeno consumido (Finaud y col. 2006).

El estrés oxidativo puede ocurrir en individuos adaptados o no al ejercicio, lo que los hace susceptibles de presentar daño en sus sistemas enzimáticos, así como en sus lípidos y receptores de membrana, e incluso en su ADN (Leeuwenburgh, C. y col. 2001; Ostenburg y col. 1997).

Durante ejercicios aerobios, el aumento del consumo de oxígeno induce una amplificación en la formación accidental de radicales libres. Si bien el prolongado tiempo de ejecución de estos ejercicios podría originar un volumen oxidativo importante, la bibliografía se muestra contradictoria al cuantificar el estrés oxidativo en ejercicios fundamentalmente aerobios (Viña y col. 2000). Cabe destacar que ejercicios aerobios exhaustantes, permiten la participación de los sistemas XOR e inflamatorio, desfasando en mucho el modelo (Sen y col 1998).

El corto tiempo de ejecución de ejercicios predominantemente anaerobios no limita la producción de radicales libres. La mutación de la XO, en primer grado; y la activación inflamatoria permiten a la maquinaria anaerobia producir tasas de

ROS muy superiores a las vías actuantes en ejercicios aerobios (Simpson y Lucchesi, 1987). Se ha demostrado que el estrés oxidativo puede ocurrir con modelos específicos de ejercicio, aunque la severidad y el nivel de daño del tejido no siempre han sido consistentes entre los estudios, incluso al usar protocolos similares. Esto puede relacionarse a las variaciones entre los diferentes estudios en varios factores, incluyendo la edad, la dieta, la historia previa de entrenamiento y los métodos analíticos (Sen C. 1995; Kanter M. M 1994; Sen, C. K. y Goldfarb A. H. 2000). Varios estudios se han conducido para evaluar los efectos de diversos tipos de ejercicio, habiendo ciertamente discrepancias entre los mismos. Marlin D. y col. (2002) no han demostrado cambios en el estatus circulante de antioxidantes en equinos durante una carrera de resistencia de 140 km. de Moffarts y col. (2005), han encontrado disminución en el estatus antioxidante de equinos sometidos a esfuerzo físico los cuales no habían recibido suplementación antioxidante previa respecto del grupo suplementado. Han sido descritos cambios en el estatus antioxidante en equinos durante ejercicio prolongado con especial énfasis en los glóbulos rojos (Marlin D. y col. 2002). Chiaradia E. y col. (1998) encontraron evidencia de estrés oxidativo pero no daños del músculo después de someter a equinos SPC a un protocolo estandarizado de ejercicio. Los caballos fueron previamente entrenados por 3 meses y después sometidos a una prueba de ejercicio de alta intensidad y corta duración. Según los resultados mencionados el entrenamiento controlado es un método propuesto para aumentar las defensas antioxidantes endógenas para proteger a los tejidos contra el estrés oxidativo inducido por el ejercicio (Chiardia E. y col. 1998; Avellini L. y col. 1999).

1.1.6.5. Sistemas de defensa biológica contra los ROS

Las concentraciones de ROS dentro del cuerpo normalmente son bien controladas y existen mecanismos para prevenir o limitar el daño. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos forman parte de los mecanismos de defensa del organismo para suprimir la formación de ROS, para eliminar radicales y reducir sus efectos dañinos, como la peroxidación lipídica (Sen, C. 1995). Hay muchos antioxidantes no enzimáticos en la célula y en sus membranas, incluyendo al α -tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), el glutatión, el ácido úrico y el selenio (Sen, C. 1995, Powers y Lennon, 1999, Boffi F. M. 2006). La vitamina C es muy importante en fase acuosa ya que neutraliza el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), captura radicales hidroxilos, captura anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ y regenera la forma oxidada de vitamina E. Los carotenos actúan eliminando al $\text{O}_2^{\bullet-}$. La vitamina E es altamente lipofílica y por lo tanto previene la peroxidación de lípidos de membrana y de lipoproteínas de baja densidad, neutraliza al ($^1\text{O}_2$), captura radicales libres hidroxilos, neutraliza peróxidos y captura anión superóxido (Sen, C. 1995). El glutatión es intracelular e interactúa con el radical hidroxil. El ácido úrico se encuentra tanto intra como extracelularmente y remueve los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\bullet\text{OH}$ y previene la oxidación de la vitamina C. Por último el selenio es un elemento esencial en la estructura de la enzima glutatión peroxidasa.

Proteínas como la ferritina, la transferrina y la Cp fijan iones de Fe y Cu, manteniendo sus concentraciones intracelulares en un bajo nivel, disminuyendo de esta manera la ocurrencia de la reacción de *Fenton* (Picco S. J. 2004).

Los sistemas enzimáticos más importantes están constituidos por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa

(GSH-Px) y glutathion reductasa (GSH-Rd), que no solo están en el citoplasma celular, sino que también están presentes en la mitocondria, que es el lugar de mayor producción de radicales libres intracelulares (Sen, C. 1995; Powers y Lennon 1999; Boffi F. M. 2006). La SOD se encuentra tanto intra como extracelularmente y es la primera barrera de defensa, elimina al $O_2^{\bullet-}$ catalizando su dismutación a H_2O_2 , que luego es transformado en H_2O por la acción de CAT y GSH-Px. Las peroxidasas pueden actuar sobre lípidos hidroperoxidados para convertirlos en compuestos menos tóxicos como los alcoholes. El glutatión (GSH) juega un rol central en estos procesos, actuando como sustrato de la GSH-Px. Es un tripéptido con tres grupos sulfhidrilos, que durante la reducción del H_2O_2 o de los lípidos hidroperoxidados es oxidado a glutatión disulfidrilo (GSSG). La GSH-Rd es la enzima encargada de regenerar el glutathion empleando el poder reductor del NADPH derivado del metabolismo celular. La CAT está en los peroxisomas y produce la dismutación del H_2O_2 . La GSH-Px produce la reducción del H_2O_2 y de hidroperóxidos orgánicos que normalmente dañan la membrana celular alterando su permeabilidad (Boffi F. M. 2006).

Otros compuestos antioxidantes que juegan un rol protector importante incluyen a la ubiquinona en las membranas celulares (Kagan V. 1990) y al ácido úrico y a la bilirrubina en el plasma (Ames B.N. 1981; Boffi F. M. 2006). Existen además compuestos con baja especificidad como antioxidantes pero que en altas concentraciones pueden tener un rol importante en la eliminación de ROS. Entre ellos se hallan los aminoácidos, los péptidos y las proteínas (Drogue W. 2002). Prácticamente todos los aminoácidos pueden ser el blanco de ataque de las ROS, pero el triptofano, la tirosina, la histidina y la cisteína son particularmente sensibles, siendo importantes como antioxidantes cuando se hallan en altas

concentraciones. Al contrario de los aminoácidos, las proteínas tienen menor eficacia como agentes antioxidantes, pero la exposición a la oxidación conduce a un incremento en su susceptibilidad a la proteólisis. Esta sensibilidad produce un incremento en la concentración de aminoácidos libres, generando un efecto antioxidante indirecto (Drogue W. 2002).

1.1.7. Ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN constituye el material genético. Se localiza mayormente en el núcleo de las células eucariotas, constituyendo, en unión con otros elementos pequeñas estructuras microscópicas conocidas como “cromosomas”. Su simpleza estructural le permite contener toda la información necesaria para que cada célula desarrolle sus funciones normales, asegurando además la transmisión de la información a las futuras generaciones de células, tanto somáticas como germinales. Dentro del núcleo, el ADN se halla asociado a una serie de proteínas que salvaguardan su integridad estructural y condicionan los procesos de duplicación y transcripción. Sin embargo, muchos agentes físicos, químicos o biológicos, de origen endógeno o exógeno, son capaces de afectar su estructura, desencadenando procesos mutagénicos, carcinogénicos o teratogénicos.

1.1.7.1. Estructura y función

Para vivir y multiplicarse, los organismos dependen de la información codificada en sus genes. Con la excepción de ciertos virus, esta información está contenida en el ADN, una gran macromolécula lineal cuya estructura permite un

sistema de codificación simple y el almacenado de una gran cantidad de información, asegurando además un copiado seguro y su traducción para la síntesis de proteínas.

La molécula de ADN está constituida por dos cadenas lineales. Cada una de ellas posee un esqueleto constituido por azúcares unidos por puentes fosfodiéster, conteniendo cada azúcar a una base nitrogenada (Figura 1.10.). Las bases nitrogenadas se dividen en púricas "adenina y guanina" y pirimídicas "timina y citocina". La estructura formada por el azúcar, fósforo y la base nitrogenada se denomina monodesoxiribonucleotido (MDN); la cadena de MDN constituye un polidesoxiribonucleotido (PDN). La ordenación de las bases constituyen las secuencias codificadas en el ADN, en donde el ordenamiento de tres bases consecutivas constituye un codón, siendo esta la unidad menor de codificación de la información genética. La estructura lineal de un gen se compone de un PDN, una secuencia lineal de codones que codifican para un polipéptido (Tamarin, R.H. 1996).

Las dos cadenas del ADN se unen por uniones relativamente débiles, los puentes de hidrógeno, entre átomos específicos de cada base enfrentada (Figura 1.11.). Estas uniones solo son posibles entre adenina (A) y timina (T) y entre guanina (G) y citocina (C). Los pares A-T y G-C son complementarios por lo que cada hebra de ADN es "complementaria". La estructura tridimensional de la molécula de ADN está conformada por una doble hélice en la que el esqueleto azúcar-fosfato se halla hacia afuera, formando un doble espiral, mientras que en su interior se hallan las bases nitrogenadas, que recuerdan los escalones de una escalera en espiral (Figura 1.12.).

Con el objeto de obtener idénticas copias de ADN para ser distribuidas en las células hijas el ADN es capaz de “replicarse”. Para ello la molécula de ADN se abre por ruptura de los puentes de hidrogeno que unen las bases apareadas. Cada cadena simple constituye un conjunto ordenado de bases que pueden unirse a MDN complementarios. El correcto ensamblado de los MDN en una secuencia predeterminada queda estrictamente determinado por la secuencia de bases de la cadena parental que actúa como molde, asegurando la fidelidad del proceso de copiado. La región en la que se está llevando a cabo la transcripción del ADN queda compuesta por dos dúplex de cadenas de ADN, conformado cada uno por una cadena parental y una neoformada. Es por este motivo que el proceso de replicación del ADN es semiconservativo.

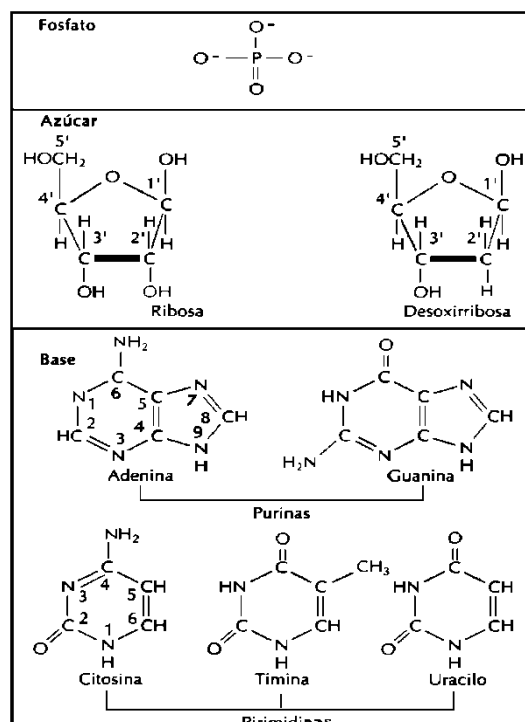


Figura 1.10. Componentes de la molécula de ADN.

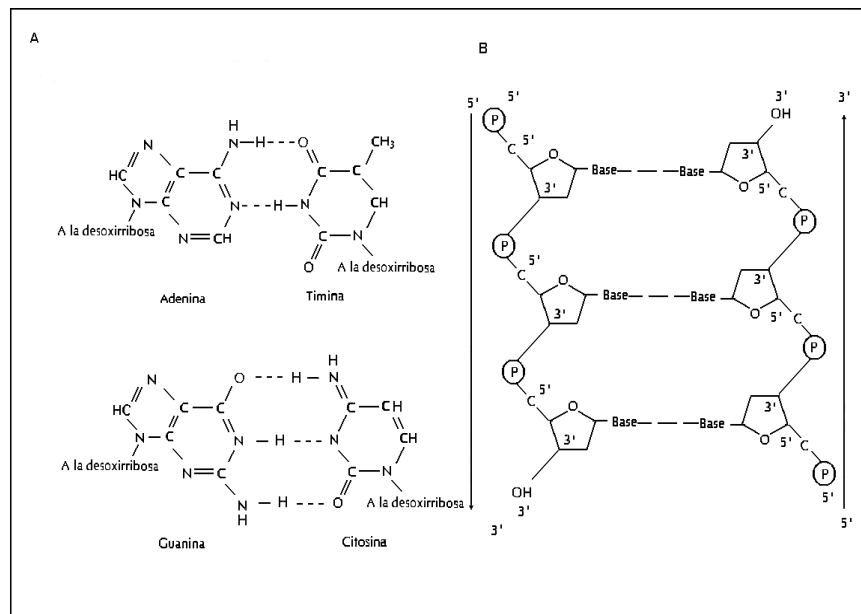


Figura 1.11. A) Puentes de hidrógeno entre adenina/guanina y timina / citosina.

B) Estructura lineal de la molécula de ADN.

La información contenida en los codones es transmitida a la maquinaria de síntesis proteica en un proceso conocido como “transcripción”. La transmisión de la información se efectúa mediante la síntesis de otra macromolécula, el ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el cual es un ácido nucleico de cadena simple en el cual la base nitrogenada T es reemplazada por el uracilo (U) y la desoxirribosa por la ribosa. La cadena del ADN es transcrita enzimáticamente a una cadena de ARNm, el cual presentara complementariedad con ella. Finalmente, fuera del núcleo se produce la “traducción” de la información contenida en el ARNm, en un proceso que implica la participación de otros dos ARN, el ARN de transferencia (ARNt) y el ribosómico (ARNr).

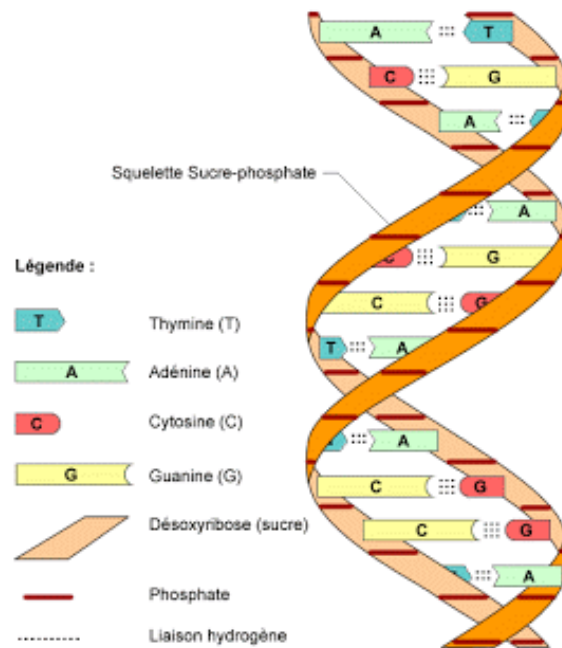


Figura 1.12. Estructura tridimensional de la molécula de ADN.

1.1.7.2. Alteración de la estructura del ADN

Dado que el ADN posee la información genética, suele asumirse que posee una extraordinaria estabilidad estructural. Sin embargo, la estructura primaria de esta molécula es dinámica y sometida a cambios constantes. Muchos de estos cambios derivan de errores introducidos durante la replicación, la recombinación o durante la misma reparación del ADN. Otros derivan de la inestabilidad química propia de los nucleótidos en condiciones de pH y temperaturas fisiológicas.

Finalmente, el ADN reacciona fácilmente con una variedad de compuestos, muchos de los cuales son producto del propio metabolismo celular, mientras que otros son generados por el hombre. Estos compuestos, al interactuar con el ADN, provocan alteraciones en su estructura primaria y la consecuencia se conoce

genéricamente como “daño en el ADN”. Según el origen del agente que causa el daño, estas alteraciones son consideradas “espontáneas” o “medioambientales” (Dulout F.N. y col. 1997; Friedberg, E.C. y col. 1995). Se asume en general que las alteraciones espontáneas se producen como consecuencia de la acción de agentes endógenos, como derivados del metabolismo celular o por errores replicacionales o de reparación, mientras que las medioambientales reconocen un agente causal, exógeno, capaz de actuar directa o indirectamente sobre el ADN (Dulout F.N. y col. 1997). Sin embargo, en muchos casos el término “espontáneas” se refiere simplemente a que se desconoce su origen (Friedberg, E.C. y col. 1995).

El daño oxidativo del ADN, por la acción de *especies reactivas de oxígeno* (ROS), puede ser considerado la mayor fuente de daño espontáneo (Ames, B.N.; Gold, L.S. 1991). Las ROS pueden afectar a cada uno de los componentes que integran los nucleótidos, pero adquieren especial relevancia cuando alteran la estructura de las bases nitrogenadas, dado que de ellas depende el código genético (Friedberg, E.C. y col. 1995). Existen evidencias experimentales de la relación entre el daño oxidativo del ADN y los procesos de envejecimiento y cáncer, los cuales indicarían el efecto deletéreo de la acumulación de alteraciones genéticas derivadas de este tipo de daño (Randerath, K. y col. 1990; Cuttler, R.G. 1991).

1.1.7.3. Alteraciones en la estructura cromosómica

Los cromosomas son estructuras nucleares perfectamente visibles durante la metafase mitótica. Se hallan conformados por ADN, proteínas histónicas y no histónicas, minerales, ARN y hasta por pequeñas cantidades de lípidos e hidratos

de carbono. Representan la forma de condensación del ADN y en esta fase están integrados por dos cromátides uninémicas y un centrómero.

Las aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) son cambios en la morfología o integridad de los cromosomas visibles durante la mitosis o la meiosis. Se las clasifica en aberraciones de tipo subcromátide, cuando no abarcan el espesor completo de la cromátide; de tipo cromátide, cuando afectan total o parcialmente una o ambas cromátides y tipo cromosoma cuando afectan a ambas cromátides del cromosoma. Bender y col. (1974) presentaron un modelo para explicar el mecanismo de producción de las ACE, basándose en la teoría de Sax (Sax, K. 1940; Sax, K 1941), concluyendo que el blanco para la producción de ACE es el ADN y que la mayoría de estas son la expresión de la ruptura de ambas cadenas de la molécula de ADN (DSB). La ruptura de ambas cadenas puede producirse directamente, por la acción del agente, o bien producirse una ruptura de cadena, seguida por la ruptura de la otra, como consecuencia de la acción de las enzimas de la reparación. Si la ruptura de ambas cadenas ocurre antes de la replicación, la duplicación en el período S generará ACE tipo cromosoma en la metafase siguiente, mientras que si esta ruptura es postreplicacional se verán en la siguiente mitosis como ACE tipo cromátide. Por su parte, las lesiones que involucren una sola cadena generarán en la mitosis siguiente una lesión acromática o brecha intersticial. Finalmente, toda lesión no reparada, se convertirá en una aberración de tipo inmediatamente mayor en el siguiente ciclo celular (Picco S. J. 2004)

En la actualidad todas las evidencias sugieren que para que se produzca una ACE es necesario la producción de una DSB (Natarajan, A.T. 2002) y para

que esta se traduzca en una ACE visible durante la mitosis es necesario además la falta de reparación de dicha lesión o bien la reparación errónea.

El agente productor de ACE se denomina “agente clastogénico” (Dulout F.N. 1996). Algunos de estos agentes son capaces de provocar una ACE sólo si el ADN se duplica durante un período S, por lo que se los conoce como agentes S-dependientes. Otros agentes, como las radiaciones ionizantes, la bleomicina, o las ROS, son capaces de generar ACE independientemente del momento del ciclo celular y son conocidos como agentes S-independientes (Dulout F.N. 1997).

1.1.7.4. Métodos de estudio del daño en el ADN

Cuando la exposición de un organismo a un agente determinado tiene como consecuencia efectos nocivos, se dice que el agente es tóxico. El fenómeno en general se denomina toxicidad y puede definirse como la capacidad relativa de un compuesto de ocasionar daño mediante efectos biológicos adversos (OMS, 1977). El concepto de toxicidad se completa con el de riesgo, que se define como “la probabilidad de que tales efectos se produzcan (OMS, 1977). El efecto de los agentes tóxicos puede ser inespecífico, cuando poseen un amplio espectro de acción en cuanto a tipos tisulares o moleculares o bien, ser específicos, cuando actúan en especial sobre determinadas moléculas. Si el objeto de la agresión es el ADN se dice que el compuesto es genotóxico y es estudiado por la genética toxicológica, rama de la toxicología que se centra en el estudio de aquellos agentes capaces de actuar directa o indirectamente sobre el ADN (Dulout F.N. 1993). La identificación de los agentes genotóxicos que afectan a poblaciones y la determinación de sus mecanismos de acción constituyen el campo de la

mutagénesis ambiental. Para la identificación del agente esta disciplina cuenta con los denominados “ensayos breves de genotoxicidad”, en los cuales se utilizan diferentes modelos experimentales que incluyen desde bacterias, pasando por plantas e insectos, hasta mamíferos y cultivos celulares. Según su complejidad se los clasifica en primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios, abarcando desde estudios estrictamente *in vitro* en células bacterianas hasta la utilización de linfocitos de sangre periférica obtenidos directamente de poblaciones expuestas a un potencial agente genotóxico (Dulout F.N. 1993; Dulout F.N. 1996). La determinación de los mecanismos de acción de un agente genotóxico incluyen técnicas y diseños más complejos, que se basan generalmente en las consecuencias de la inducción de daño en ADN y las posibles respuestas que ella desencadena. Por tal motivo es frecuente la utilización, en combinación con el agente inductor, de agentes de conocido efecto genotóxico (bleomicina, H₂O₂, etc.) y de inhibidores de la reparación del ADN (drogas antitopoisomerasas, derivados benzamídicos, etc.), así como un estricto seguimiento de las fases del ciclo celular y de la progresión mitótica.

1.1.7.5. Estrés oxidativo y daño oxidativo del ADN

Las ROS producidas ya sea en forma endógena o exógena pueden atacar simultáneamente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en las células vivas (Lily L.y col. 2004). Los efectos de las ROS incluyen además la producción de metabolitos tóxicos originados en la alteración de los lípidos de membrana, como ciertos lipoperóxidos y aldehídos, los cuales son capaces de atacar y dañar al ADN. Además, son capaces de alterar diferentes rutas metabólicas por inhibición de

enzimas, así como afectar incluso a los mismos mecanismos de reparación del ADN, daño a las enzimas responsables o alterando la síntesis de nucleótidos (Joenje, H. 1989).

El ataque de las ROS al ADN puede producir deleciones, mutaciones y otros efectos genéticos letales. Tanto el azúcar como las bases nitrogenadas son blancos potenciales, causando degradación de las bases nitrogenadas, rupturas de cadena y uniones cruzadas entre el ADN y proteínas (Imlay, J.A. y Linn, S. 1986). El ataque a las bases nitrogenadas puede producir alteraciones en su estructura o la pérdida misma de la base, mientras que el ataque al azúcar puede conducir a la producción de rupturas de cadena en la molécula de ADN (Friedberg, E.C. y col. 1995; Ercal, N. 2001; Kasprzak, K 2002).

En el ADN nuclear y mitocondrial, el 8-hydroxydeoxyguanosina (8-OHdG), un nucleótido oxidado del ADN, es el más frecuentemente detectado y estudiado en la lesión de ADN. Tras la reparación del ADN, 8-OHdG se excreta en la orina. Numerosas evidencias han indicado que 8-OHdG urinario no sólo es un biomarcador generalizado de estrés oxidativo celular, sino que también podrían ser un factor de riesgo para el cáncer, la aterosclerosis y la diabetes (Lily L. y col. 2004).

1.1.7.6. Sistemas de protección del ADN contra el daño oxidativo

Para protegerse del daño oxidativo los organismos han desarrollado una serie de barreras defensivas que incluyen la compartimentalización celular, los sistemas antioxidantes propiamente dichos, los mecanismos de reparación del ADN y optativamente la apoptosis celular o la detención del ciclo celular.

La compartimentalización celular resulta una manera efectiva de proteger al ADN, separándolo de los lugares de producción de ROS como mitocondrias y peroxisomas. El hecho de que el ADN esté rodeado de histonas y poliaminas, y que estas se organicen en una estructura de orden mayor como la cromatina, proveen un elemento de protección adicional contra el daño oxidativo (Friedberg, E.C. y col. 1995).

Las defensas antioxidantes naturales constituyen el principal mecanismo de defensa contra el efecto de las ROS e incluyen una serie de compuestos y enzimas que actúan en estrecha vinculación con la cadena de reacciones de oxidación.

Una vez producido el daño en la molécula de ADN, y dependiendo de su magnitud, la célula puede optar por la reparación del mismo, por la detención del ciclo celular o por la muerte celular vía apoptosis (Friedberg, E.C. y col. 1995).

Los mecanismos de reparación del daño constituyen la primera barrera de defensa antioxidante una vez que se ha producido el daño. Tienen como objetivo minimizar las consecuencias adversas de la oxidación y operan a través de una intrincada red de mecanismos. Mientras que los errores de replicación son corregidos mayoritariamente por la vía del apareamiento erróneo (mismatch pathway) y las rupturas de doble cadena por procesos de recombinación homóloga o ilegítima, el principal camino para la eliminación de bases dañadas y distorsiones en la hélice es el mecanismo de reparación por escisión, subdividido en reparación por escisión de bases (REB) y reparación por escisión de nucleótidos (REN).

Otra respuesta al daño en el ADN es la regulación de la progresión del ciclo celular por activación de puntos de control (DNA damage Chekpoint) (Figura

1.13). Estos poseen la capacidad de frenar la progresión del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN, controlar la activación de los mecanismos de reparación, movilizar a las proteínas de la reparación al sitio del daño, activar los procesos de transcripción, y si es necesario, conducir a la célula hacia la apoptosis. Existen al menos tres puntos principales de control, ubicados en G1, S y G2. El primero tiene como objetivo evitar la transcripción con errores y los dos últimos evitar la transmisión de los errores (Friedberg, E.C. y col. 1995; Baserga, R. 1998). Finalmente, en los casos más severos, la célula puede optar por la apoptosis y de esta manera evitar el riesgo de trasladar el error a futuras generaciones de células (Baserga, R. 1998; Friedberg, E.C. y col. 1995).

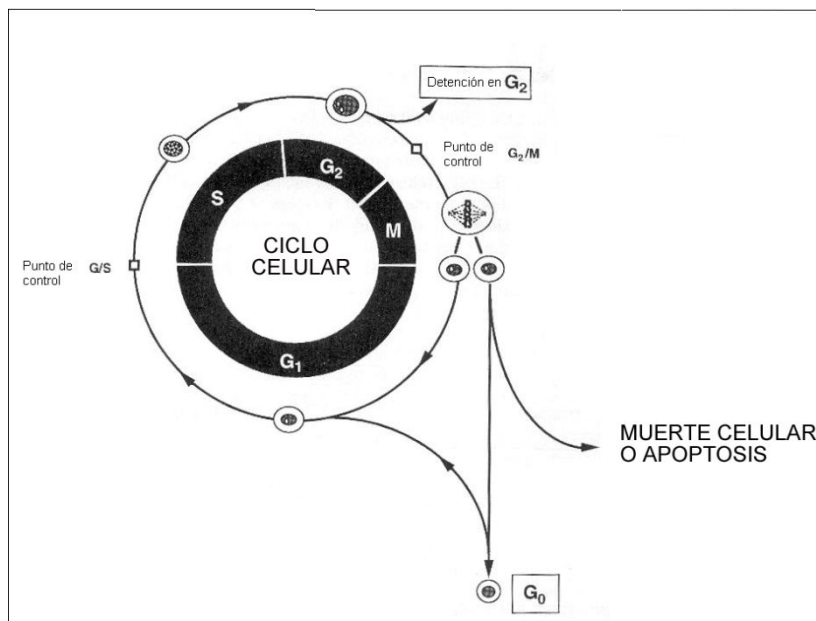


Figura 1.13. Ciclo celular, puntos de control del ciclo celular y alternativas celulares ante el daño en el ADN (Modificado de Baserga, R. 1998).

1.1.7.7. Determinación del daño inducido por el ejercicio al ADN celular

Como mencionamos anteriormente el ejercicio vigoroso induce estrés oxidativo, que puede causar modificaciones del ADN. Entre las modificaciones del ADN encontramos roturas de la cadena, sitios abásicos, y enlaces cruzados de proteína-ADN, todos ellos pueden ser medidos usando métodos bioquímicos. Las roturas de doble y simple cadena, así como sitios álcali lábiles se pueden detectar usando SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), mientras que la acción clastogénica se puede evaluar utilizando técnicas citogenéticas.

Los niveles de 'estado estacionario' de la oxidación del ADN pueden ser evaluados a partir de la hidrólisis química del ADN aislado de células por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El análisis HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) se ha llevado a cabo para la detección de 8-OHdG, el biomarcador más importante y ampliamente utilizado de daño oxidativo del ADN, ya que representan 5% de las bases totales oxidadas en el ADN y está presente en cantidades que son suficientes para ser detectados fácilmente (Helbock H. J. y col. 1999). La base promutagénica, 8-OHdG en el ADN se forma a partir del ataque de radicales de oxígeno (radical hidroxilo) a la 2'- desoxiguanosina (dG) como resultado de estrés oxidativo, reemplazando el átomo de H⁺ por un HO•. Este 8-OHdG es un factor potencialmente importante en la carcinogénesis, porque 8- OHdG preferentemente forma pares de bases con la adenina en lugar de citosina, generando transversiones de G a T, que se encuentran con frecuencia en los genes tumorales. Por lo tanto, los aumentos en el nivel de 8-OHdG pueden tener implicaciones importantes para la mutagénesis y la inducción de tumores (Remmen H.V. y col. 2003; Lily L.y col. 2004). Sin embargo, estas lesiones también pueden ser reparadas y así ser eliminadas del

ADN nuclear. La reparación de 8-OHdG en el ADN implica la escisión de base produciendo 8-hydroxyguanina (8-OHGua) y la reparación por escisión de nucleótidos produciendo 8-OHdG, que se excreta en la orina (Lily Ly col 2004). Loft y col 1994 han sugerido una relación entre el consumo de oxígeno y la excreción urinaria de esta base modificada, y concomitantemente elevados niveles de 8-OHdG en la orina de los atletas después del ejercicio vigoroso.

Los métodos citogenéticos dan una indicación específica de los efectos mutagénicos, pero sólo en las células proliferantes (Gandhi y Gunjan, 2009). Intercambios de cromátidas hermanas (SCE) son intercambios recíprocos entre las moléculas de ADN de un cromosoma replicado. Los micronúcleos (MN) son pequeños fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros, que no están integrados en la célula hija durante la división celular. Varios estudios han informado de la evaluación de la SCE y MN en individuos durante la actividad física (Hartmann y col. 1994; Schiffli y col, 1997; Umegaki y col.1998).

La técnica unicelular de electroforesis en gel de células aisladas o análisis cometa (SCGE / cometa) también se ha utilizado para demostrar el elevado daño del ADN en los leucocitos de humanos después de diversas formas de ejercicio (Hartmann y col. 1995; Niess A. M. y col. 1996, 1998; Mastaloudis A. y col. 2004). El ensayo es una técnica de electroforesis en gel que permite la detección de daños y la reparación del ADN en células individuales con una alta sensibilidad (Singh N. P. y col. 1988; Hartmann A. y col. 2003). Las modificaciones en las bases de ADN inducida por radicales oxidativos después de la terapia con oxígeno hiperbárico y el ejercicio han sido detectadas in vitro con una alta sensibilidad utilizando una modificación del ensayo cometa (Hartmann y col.1998).

1.1.8. Lípidos y peroxidación lipídica

Aunque no existe una definición universalmente aceptada de “lípidos”, la definición propuesta por Christie remonta a los orígenes del término y grafica adecuadamente este amplio grupo de compuestos: *“Lípidos son ácidos grasos y sus derivados, y sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente a estos compuestos”*. (Christie, 1987)

Los lípidos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos con funciones importantes diversas en el organismo tales como provisión de energía, constituyentes de membranas celulares y tejidos nerviosos, aislantes térmicos y eléctricos, función hormonal local, etc. Los ácidos grasos tienen cuatro destinos fisiológicos: 1) forman parte de la estructura de los fosfolípidos y glucolípidos, componentes importantes de las membranas biológicas, 2) muchas proteínas son modificadas por la unión covalente de ácidos grasos, para ser dirigidas hacia posiciones de membrana, 3) son moléculas que pueden ser oxidadas para obtener energía. Son almacenadas en forma de triacilglicéridos (grasas neutras, triacilgliceroles): ésteres de ácidos grasos con glicerol. Los ácidos grasos son movilizados desde los triacilglicéridos y oxidados para cubrir las necesidades de la célula o del organismo, y 4) Los derivados de ácidos grasos actúan como hormonas y mensajeros intracelulares.

Los ácidos grasos son compuestos sintetizados en la naturaleza por condensación de unidades de malonil- coenzima A por el complejo sintetasa de ácidos grasos. Según esta definición el colesterol (pero no las hormonas esteroideas) puede ser considerado un lípido, así como los fosfolípidos y glicolípidos.

Los ácidos grasos de origen vegetal, animal y microbiano generalmente están formados por cadenas de números pares de átomos de carbono, con un grupo carboxilo en un extremo y con dobles enlaces, si estuvieran presentes, en configuración *cis*. En tejidos animales, los ácidos grasos más comunes varían entre 14 y 22 átomos de carbono, pero en ocasiones pueden ampliar el rango de 2 a 36 y aún más. Los ácidos grasos no saturados de origen animal usualmente presentan entre uno y seis dobles enlaces mientras que en plantas raramente superan los tres. Ácidos grasos hidroxilados son sintetizados en algunos tejidos animales, pero ácidos grasos con otros grupos funcionales, cuando se encuentran presentes, provienen usualmente de la dieta. Los ácidos grasos vegetales y microbianos pueden contener una amplia variedad de grupos funcionales incluyendo dobles enlaces en configuración *trans*, enlaces acetilénicos, grupos epoxilo, hidroxilo, ceto y éter y anillos ciclopropeno, ciclopropano y ciclopenteno.

Los ácidos grasos saturados más abundantes en tejidos animales y vegetales son compuestos de cadena lineal de 14, 16 y 18 átomos de carbono, pero todos los ácidos grasos con número par e impar, entre 2 y 36 átomos de carbono se han encontrado en la naturaleza en su forma esterificada. Ácidos grasos de cadena impar son sintetizados en muchos microorganismos y son producidos, aunque en forma muy limitada, en tejidos animales cuando la sintetasa de ácidos grasos acepta propionil- coenzima A como sustrato.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de origen animal pueden clasificarse en familias de acuerdo a sus precursores biosintéticos y la proximidad del primer doble enlace al grupo metil terminal (n u omega). Así, las familias contienen de 2 a 6 dobles enlaces, separados por grupos metilenos simples y la misma estructura terminal. El ácido linoleico (18:2 n -6) es el más abundante en

tejidos vegetales y animales. Es un ácido graso esencial en la dieta animal ya que no puede ser sintetizado en tejidos animales y es requerido para el crecimiento, reproducción y salud normales. Dado que las enzimas en animales sólo pueden insertar nuevos dobles enlaces entre un doble enlace existente y el grupo carboxilo, el ácido linoleico sirve como precursor de la familia n-6 de ácidos grasos formados por desaturación y elongación de la cadena, en la que la estructura terminal es conservada. De esta familia, el ácido araquidónico (20:4 n-6) es particularmente importante como componente de membrana y como precursor de prostaglandinas. Las enzimas vegetales son capaces de insertar un doble enlace en la región terminal de un doble enlace ya existente. El ácido linolénico (18:3 n-3) es el punto final de biosíntesis en la mayoría de plantas superiores. Es un ácido graso esencial y, por lo tanto, debe incorporarse a los tejidos animales por medio de la dieta. Es el precursor de la familia n-3 que incluye al ácido docosapentenoico (DPA, 20:5 n-3), precursor de prostanoides específicos y al ácido docosahexenoico (DHA, 22:6 n-3), que posee funciones específicas en los fosfolípidos de tejido nervioso y en el ojo. En cada paso, las cascadas de n-3 y n-6 compiten por las enzimas aunque su afinidad por las enzimas y su habilidad por inhibir las desaturasas es diferente (la afinidad de los ácidos grasos es n-3: n-6: n-9- 10:3:1) (Tvrzicka y col, 2011).

El grado de no saturación de ácidos grasos es el principal determinante de la temperatura de fusión de triglicéridos, como de la fluidez de membranas biológicas que están compuestas por fosfolípidos. Los PUFAs de cadena larga, tales como ácido araquidónico y docosahexenoico poseen funciones biológicas cruciales tales como conferir flexibilidad y permeabilidad selectiva a membranas

celulares en eucariotas, entre otros procesos celulares y fisiológicos tanto en plantas como en animales (Catalá, 2011).

1.1.8.1. Daño por radicales libres a los lípidos

El daño oxidativo a ADN, proteínas y lípidos puede dar lugar a desorganización, disfunción y destrucción de membranas, enzimas y proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1990; Halliwell 1997). Específicamente, la peroxidación de los lípidos de membrana (Figura 1.14) puede causar deterioro de la función de membrana, disminución de la fluidez, inactivación de receptores y enzimas unidos a membranas, permeabilidad a iones aumentada y eventualmente, ruptura de membrana (Gutteridge y Halliwell, 1990; Gutteridge, 1995). Si el estrés oxidativo es particularmente severo puede producirse la muerte celular (Halliwell, 1997; Dypbukt y col, 1994). La muerte celular puede ocurrir por necrosis pero en ciertos tipos celulares, tales como células neuronales, un estrés oxidativo leve puede inducir el proceso de apoptosis (Stoian y col, 1996; Hampton, Orrenius, 1997).

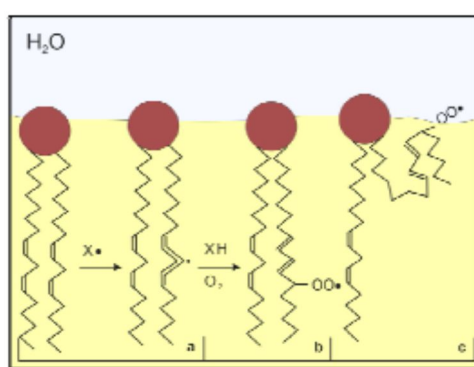


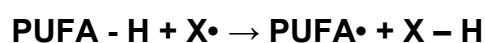
Figura 1.14. Peroxidación lipídica en membranas: a) iniciación de peroxidación, b) formación de dienos conjugado y oxigenación para formar luego un radical peroxilo y c) el radical peroxilo se sitúa en la interfase membrana-agua. (Adaptado de Buettner, 1993).

1.1.8.2. Peroxidación lipídica no enzimática

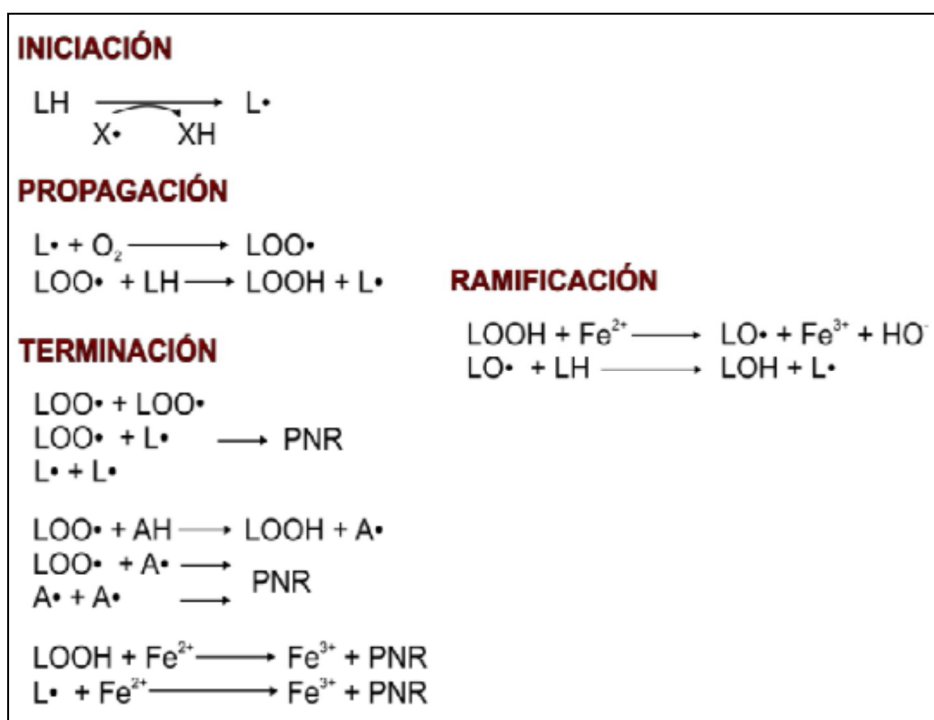
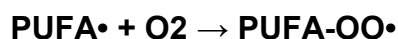
La peroxidación lipídica es probablemente la reacción mediada por radicales libres más estudiada (Halliwell y Gutteridge, 1999; Gutteridge, 1995; Halliwell y Gutteridge, 1990). Una de las primeras descripciones de las diferentes etapas de la peroxidación lipídica data de finales de los años '20 y fue realizada por De Saussure, que empleó un simple manómetro de mercurio para estudiar el consumo de oxígeno por una capa de aceite de nuez en agua (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los lípidos que contienen PUFAs son particularmente susceptibles a la peroxidación debido a que sus hidrógenos bis-alílicos son fácilmente "extraíbles" ($E^\circ = +600$ mV) comparados con los hidrógenos alifáticos ($E^\circ \approx +1900$ mV). De esta manera, cualquier especie oxidante cuyo potencial de reducción se encuentra por encima del de los PUFA-H puede dar inicio a la peroxidación. Una vez iniciado el proceso, éste prosigue como una reacción en cadena, involucrando las etapas de propagación, ramificación y terminación (Gutteridge, 1995) (Esquema 1.3.).

1.1.8.2.1. Reacción en cadena de la peroxidación lipídica

La *iniciación* de la peroxidación lipídica se origina por el ataque de cualquier especie con suficiente reactividad ($X^\bullet =$ radical X) para sustraer un átomo de hidrógeno a un grupo metileno de un PUFA.

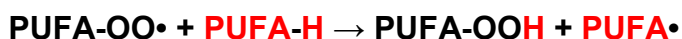


Dado que un átomo de hidrógeno es un radical libre ya que posee un electrón simple desapareado, su salida deja un electrón desapareado en el átomo de carbono al cual estaba originalmente unido. El radical centrado en carbono ($L\cdot$ ó $PUFA\cdot$) es estabilizado por una reorganización de los enlaces que da lugar a la formación de dienos conjugados, seguida por una rápida reacción con oxígeno para dar un radical peroxilo ($LOO\cdot$ ó $PUFA-OO\cdot$). Esta reacción es termodinámica y cinéticamente favorable.



Esquema 1.3. Esquema simplificado de las principales reacciones involucradas en el proceso de peroxidación lipídica. LH: lípido; $X\cdot$: radical libre iniciador; $L\cdot$, $LO\cdot$, $LOO\cdot$: radicales libres producidos a partir de LH; LOOH: hidroperóxido lipídico; AH: antioxidante; $A\cdot$: radical libre del antioxidante; PNR: productos no radicales.

Los LOO• poseen un potencial de reducción mayor al de los radicales L•, por lo que son capaces de sustraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso para formar un hidroperóxido (LOOH) y un radical (L•) lipídico.

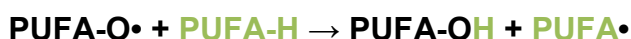


Cuando el radical LOO• quita un átomo de hidrógeno de un ácido graso, el nuevo radical L• puede reaccionar con oxígeno para formar otro radical LOO•, constituyendo una *propagación* de la reacción en cadena.

La reacción de peroxidación puede sufrir una *ramificación* cuando el LOOH sufre ruptura mediada por metales reducidos, como Fe²⁺

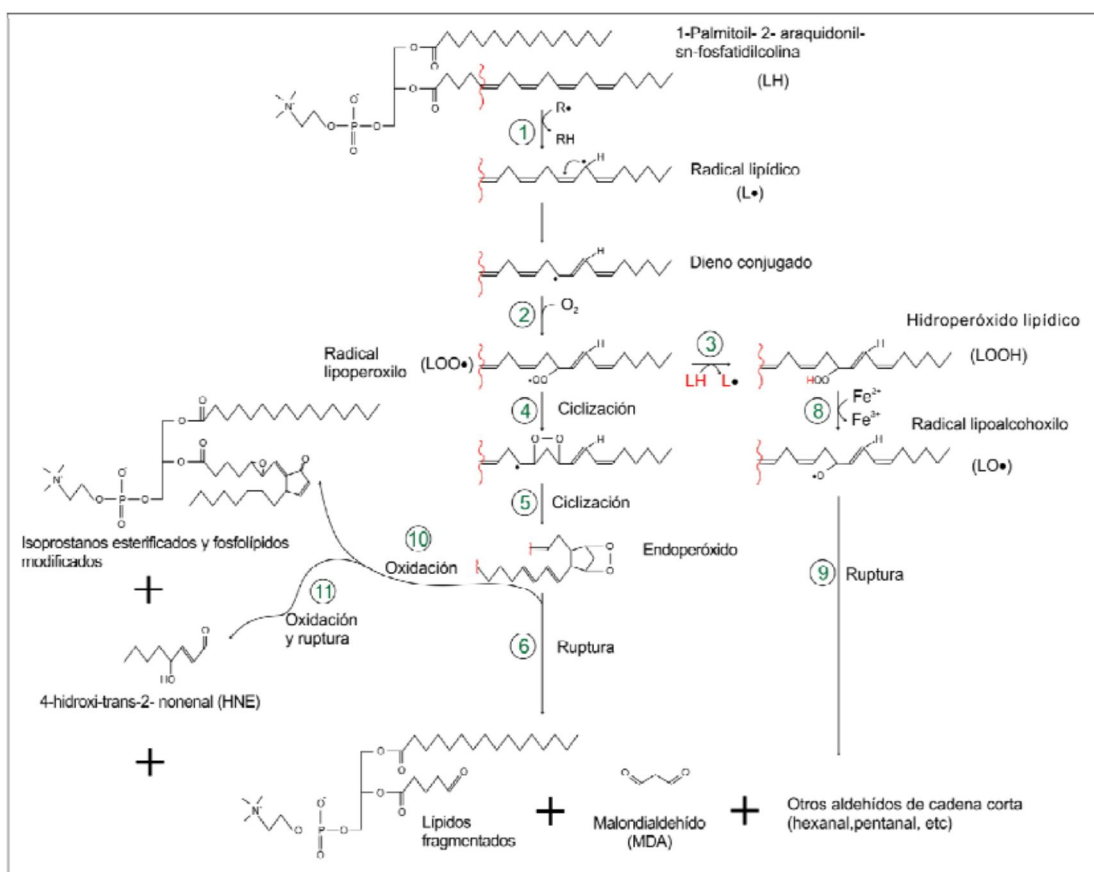


El radical alcoxilo formado (LO•) posee un potencial de reducción superior al del radical L• por lo que puede iniciar reacciones en cadena adicionales.



La extensión de la cadena de propagación antes de la terminación depende de varios factores, por ej: la concentración de oxígeno y los antioxidantes presentes. Los hidroperóxidos (productos primarios de peroxidación) son moléculas bastante estables, pero su descomposición puede ser estimulada por temperaturas elevadas o por metales de transición (iones hierro y cobre). La descomposición de hidroperóxidos genera una mezcla compleja de productos

secundarios de peroxidación lipídica como hidrocarburos gaseosos (etano, pentano) y aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxi-nonenal). La *terminación* de la peroxidación lipídica puede darse entonces por combinación de especies reactivas entre sí para formar productos no radicales o por reacción de estas especies con antioxidantes (Esquema 1.4.) (Buettner, 1993).



Esquema 1.4. Vías de peroxidación lipídica en un fosfolípido y formación de varios de sus productos (adaptado de Spickett y col, 2010 y Valko y col, 2005). Los átomos de hidrógeno de los ácidos grasos poli-no-saturados, luego de la interacción con un radical (R^\bullet), son removidos para formar un radical lipídico (L^\bullet) (1). El radical lipídico reacciona con oxígeno molecular para formar un radical peroxilo (LOO^\bullet) (2). El radical peroxilo puede sustraer un hidrógeno de una

molécula de ácido graso cercana, generando un hidroperóxido lipídico (LOOH) estable en ausencia de metales (3) o bien, por ciclización, (4) producir un peróxido cíclico. Tras una segunda ciclización (5) puede formar un endoperóxido que al descomponerse (6) genera diversos lípidos fragmentados, malondialdehído y otros aldehídos e hidrocarburos de cadena corta. El hidroperóxido lipídico puede reaccionar con metales redox (por ej, hierro) para producir un radical alcohoxilo ($LO\bullet$) (8) que por ruptura (9) puede generar aldehídos e hidrocarburos. Por oxidación (10), el endoperóxido genera isoprostanos esterificados y fosfolípidos modificados. Una nueva reacción de oxidación y posterior ruptura (11) genera aldehídos tales como el 4-hidroxinonenal. Los productos de peroxidación lipídica son capaces de reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos.

1.1.8.2.2. La estructura del ácido graso determina el producto final

Otro aspecto en la complejidad del proceso de la peroxidación lipídica es que la abstracción inicial de un átomo de hidrógeno puede ocurrir en diferentes puntos de la cadena carbonada del ácido graso. De esta manera, la peroxidación del ácido araquidónico, por ejemplo, genera seis diferentes hidroperóxidos lipídicos como peróxidos cíclicos y otros productos como isoprostanos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Además, el número de doble enlaces determina la susceptibilidad de los ácidos grasos a la peroxidación (Porter y col, 1995). Un doble enlace debilita la unión del átomo de hidrógeno con el carbono adyacente. Por lo tanto, a mayor número de dobles enlaces en un ácido graso, más fácil resulta remover un átomo de hidrógeno. “Es por esta razón que los PUFAs son más susceptibles a la peroxidación”.

Como productos de la peroxidación lipídica se genera una gran diversidad de aldehídos. Se forman en los sistemas biológicos cuando los hidroperóxidos lipídicos se descomponen. Algunos de estos aldehídos son altamente reactivos y pueden considerarse como segundos mensajeros tóxicos que difunden y aumentan los eventos iniciales de los radicales libres. Los aldehídos más intensamente estudiados hasta ahora son 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) y malondialdehído (MDA) (Figura 1.15). El MDA, es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo, generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de PUFAs (Janero, 1990) y también durante el metabolismo de ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas. MDA puede combinarse con diversos grupos funcionales de proteínas, lipoproteínas, ARN y ADN (Sevilla y col, 1997). HNE es conocido por ser el principal aldehído formado durante la peroxidación de lípidos conteniendo PUFAs n-6, tales como el ácido linoleico y ácido araquidónico. Por otro lado, la peroxidación lipídica de los PUFAs n-3 como ácido linolénico y docosahexenoico genera un compuesto estrechamente relacionado, HHE, que es un mediador potencial de la transición de la permeabilidad mitocondrial (Kristal y col, 1996). 4-hidroxi-2-alquenes representan las sustancias más importantes de tipo aldehído generadas durante la peroxidación de lípidos. HNE fue identificado como un aldehído citotóxico hace tres décadas, formado durante la peroxidación inducida por NADPH-Fe²⁺ de lípidos microsomales hepáticos. Desde entonces, un gran número de informes han demostrado la intervención de este compuesto en una diversidad de procesos patológicos. HNE es considerado como un indicador de estrés oxidativo y un probable agente colaborador de varias enfermedades (Spickett y col, 2010).

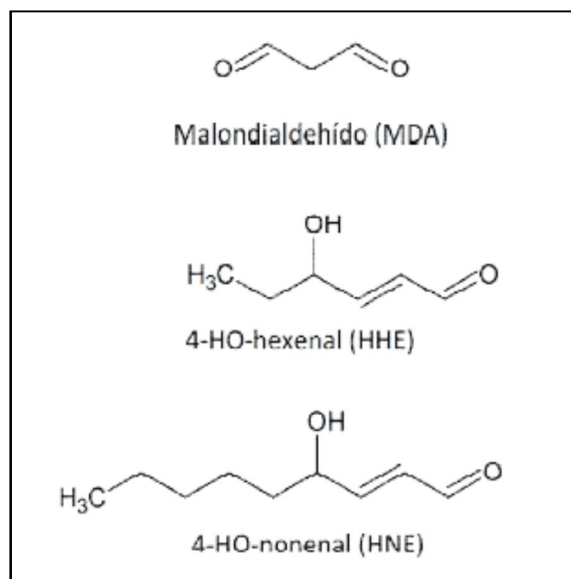


Figura 1.15. Principales aldehídos generados durante la peroxidación lipídica.

Por otro lado, los lípidos que contienen PUFAS n-6 forman isoprostanos (64 isómeros) y los que contienen PUFAs n-3 forman neuroprostanos. Los productos formados dependen de la naturaleza del ácido graso (número de átomos de carbono y de dobles enlaces) y del número de eventos de peroxidación, lo que hace que la complejidad de productos sea muy elevada. Cientos de productos diferentes se han identificado sólo para glicerofosfolípidos (Spickett y col, 2010).

1.1.8.3. Peroxidación lipídica enzimática

La peroxidación de PUFAs puede darse no sólo a través de vías mediadas por radicales libres, sino también por reacciones enzimáticamente catalizadas (Gutteridge, 1995). La peroxidación lipídica enzimática se refiere a la generación de hidroperóxidos por la inserción de oxígeno molecular en el centro activo de la

enzima. Los radicales libres son probablemente intermediarios importantes de las reacciones enzimáticas, pero están localizados en el sitio activo de la enzima. Ciclooxygenasa (COX) y lipooxygenasa (LO) satisfacen la definición de peroxidación lipídica enzimática dado que catalizan la peroxidación controlada de varios sustratos lipídicos. Los hidroperóxidos y endoperóxidos producidos enzimáticamente son esteroespecíficos y tienen importantes funciones biológicas. Ambas enzimas están involucradas en la formación de eicosanoides, que comprenden a una gran y compleja familia de lípidos biológicamente activos derivados de PUFAs con 20 átomos de carbono. Las prostaglandinas son producidas por peroxidación catalizada por COX de ácido araquidónico (Samuelsson y col, 1975). COX posee al menos dos isoformas, COX-1 está presente en células en condiciones fisiológicas mientras que COX-2 es inducida en macrófagos, células epiteliales y fibroblastos por diversos estímulos inflamatorios dando lugar a la liberación de prostaglandinas (Vane y Botting, 1995).

1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1. Hipótesis de trabajo.

La realización de ejercicios de alta intensidad en equinos provocará condiciones ambientales internas pro-oxidantes que conducirán a la producción de daño oxidativo en moléculas de alta relevancia biológica como son el ADN y los lípidos de membrana.

1.2.2. Objetivo General.

El objetivo general de la presente tesis fue establecer la existencia de daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y su vinculación con modificaciones oxidativas en los elementos formes de la sangre durante el desarrollo de modelos de ejercicio de alta intensidad.

1.2.3. Objetivos Particulares.

- 1) Determinar la presencia de daño en la molécula de ADN de leucocitos de sangre periférica en caballos Árabes y sus cruzas sometidos a un test de ejercicio de alta intensidad.
- 2) Determinar la presencia de alteraciones oxidativas en la membrana de eritrocitos en caballos Árabes y sus cruzas sometidos a un test de ejercicio de alta intensidad.

- 3) Determinar la asociación de las variables estudiadas en los objetivos 1 y 2 con el consumo de oxígeno y la concentración de lactato en sangre, como indicadores del estatus metabólico energético durante el ejercicio.

- 4) Determinar la asociación de las variables estudiadas en los objetivos 1 y 2 con el comportamiento global de eritrocitos y leucocitos, y con indicadores indirectos de daño tisular.

- 5) Establecer la cinética del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica de equinos SPC sometidos a un test de ejercicio de alta intensidad y su relación con el consumo de oxígeno y los niveles de lactato en sangre.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se realizaron dos experimentos con protocolos de ejercicio máximo diferentes y en distintas razas de equinos.

El experimento 1 se llevó a cabo utilizando caballos Árabes y Cruza Árabes. Durante los test de esfuerzo físico se extrajeron muestras para VO_2 y VO_2 max, lactacidemia, peroxidación y composición de lípidos de membrana de eritrocitos circulantes, daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica, hematocrito, concentración de hemoglobina en sangre, uremia y concentración de creatina fosfoquinasa (CPK) plasmática.

Para el Experimento 2 se utilizaron equinos de raza SPC y se realizaron mediciones de VO_2 y VO_2 max, lactacidemia y daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica.

2.1. EXPERIMENTO 1:

2.1.1. Animales experimentales

Se utilizaron 7 equinos, 4 Árabes puros y 3 Cruza Árabes, con un excelente estado nutricional y de salud. Estos fueron alojados en boxes del Hospital Escuela y del Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata durante todo el período de ensayo. Los animales se alimentaron en base a un 2,5% del peso corporal de materia seca. La dieta presentaba una relación 50:50 de heno (rollo

de pastura) y concentrado (alimento balanceado con un 12% de proteína y 2,75 Mcal/Kg), y agua ad-libitum.

Tabla 2.1. Características de los equinos utilizados en el experimento 1.

Caballos (Número)	Raza	Alzada (cm)	Edad	Peso (kg)
1	A	144	5	349
2	A	152	8	437
3	A	139	3	316
4	A	143	4	330
5	CA	148	4	350
6	CA	154	5	436
7	CA	147	3	386

❖ A: Árabe, CA: Cruza Árabe

2.1.2. Test de ejercicio estandarizado

Los test de ejercicio estandarizado (SET= standardized exercise test) son test de esfuerzo físico con velocidad controlada, en muchos casos incremental (*incremental speed exercise test*), los cuales permiten reproducir o simular un esfuerzo de competencia máxima bajo condiciones medianamente controladas, los mismos pueden desarrollarse en laboratorios con cintas ergométricas (treadmill) ó en pistas de carreras.

En el presente experimento los equinos realizaron los SET en el Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Nacional de La Plata, sobre una cinta

ergométrica para equinos (ver foto 1), marca Kagra, modelo Mustang 2200. La misma se encuentra instalada en un edificio con las siguientes dimensiones: largo 14,6 metros, ancho 9 metros y alto 10 metros. Este edificio consta de un piso de goma antideslizante para evitar que los equinos resbalen, dos ventiladores frontales para poder simular la fricción del viento cuando el animal corre sobre una pista, un reloj de pared en donde se registran la presión barométrica (mbar), temperatura (°C), y la humedad relativa ambiente (%), para saber las condiciones ambientales donde el animal realiza el esfuerzo físico. Las características técnicas de la cinta ergométrica son:

- Longitud: 10,3 metros.
- Ancho: 3,64 metros.
- Altura del piso a la banda: 0,55 metros.
- Altura máxima: 4,3 metros.
- Peso: 3770 kilos.
- Dimensiones del tapiz rodante: 4 metros de largo por 1,2 metros de ancho.
- Velocidad de la máquina: rango de 0 a 15 m/seg.
- Porcentaje de inclinación: rango de 0 a 11%.
- Factor de carga permanente: hasta 700 kgs.
- La velocidad y porcentaje de inclinación es manejado, por una computadora que contiene un programa para tal efecto.



Foto 2.1. Test de esfuerzo en cinta con mascara ergo-espirométrica.

2.1.2.1. Protocolo de ejercicio

Previo a la realización de los test de ejercicio todos los equinos tuvieron un período de adaptación a la cinta y a la máscara del ergo-espirómetro que consistió en: a) Colocación de la máscara para ergo-espirometría sin subir a la cinta hasta que la toleren, b) Ascenso y descenso a la cinta sin rodarla, y luego de la aclimatación se los sometió a una adaptación activa primero con caminata, luego trote y para finalizar galope sin la colocación de la máscara, y por último c) se realizaron varias pruebas sobre la cinta ergométrica con la máscara colocada a diferentes velocidades. Este tiempo de adaptación varió con cada individuo pero rondó en promedio los 7 días.

Se llevó a cabo un test de ejercicio estandarizado (SET) el cual se realizó de la siguiente manera: un precalentamiento de 1 min. a 1,5 m/s y 4 min. a 4 m/s;

a continuación se realizaron etapas de 1 min. de duración con intensidades crecientes (5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13 m/seg, etc.) y con una pendiente del 3 % hasta alcanzar el punto de fatiga. Alcanzado el mismo se realiza la fase de recuperación sin pendiente a 4 y 1,5 m/s durante 4 y 1 min., respectivamente.

2.1.3. Ergo-espirometría

Los registros ergo-espirométricos fueron obtenidos a través del sistema Cortex Biophysik MetaVet. El equipo se calibra con cada caballo en particular en función de las condiciones atmosféricas (temperatura ambiental, presión atmosférica, humedad relativa ambiente, presión de oxígeno ambiental y presión de dióxido de carbono ambiental) donde se va a realizar el SET. Una vez calibrado el equipo, se le coloca al equino la máscara provista de sensor de flujo /volumen, y luego se lo sube a la cinta ergométrica para dar inicio al SET (ver fotos más abajo).

2.1.3.1. Equipo básico de ergo-espirometría

Consta de los siguientes componentes:

- Sistema base MetaVet: equipo que integra y almacena los datos de las mediciones cardiopulmonares durante un ejercicio en treadmill y los computa. Peso de 1800 gramos, con una longitud de 210 mm, un ancho de 110 mm y un espesor de 160 mm. Capacidad de almacenamiento de 8 horas. (ver Foto 2)

- Sensor de flujo/volumen: Sensor para medir flujo/volumen en los caballos con doble entrada de aire lo cual provee una resistencia extremadamente baja. Este se encaja a presión en la máscara y es sostenido por una banda elástica. Sensor de flujo: de tipo ultrasónico con un rango de ± 100 litros, una resolución de 0,04 l/s peso de 750 grs, con 260 mm de largo, 160 mm de ancho y 45 mm de espesor y una precisión de $\pm 2\%$ entre 50 a 100 l/s $\pm 3\%$ entre 0 a 50 l/s. Analizador de O₂, de óxido de sinconiun, con un rango de 0 a 25 volumen % de O₂ y una exactitud de 0,2 volumen %. Analizador de CO₂, de absorción infrarroja, con un rango de 0 a 10 volumen % de CO₂ y una exactitud de 0,2 volumen %. (ver Foto 2)
- Máscara nasal para equinos: Máscara de PVC amoldada para que abarque en su totalidad el hocico del equino, provista de un sistema de cierre caudal con una goma que se insufla con aire para permitir un cierre hermético. En su porción rostral presenta dos escotaduras las cuales coinciden con cada uno de los ollares y a las cuales se acopla el sensor de flujo volumen. Peso 720 grs, con una longitud de 250 mm, un ancho de 240 mm y un espesor de 220mm. (ver Foto 3)
- Cabezada para sostener la máscara a la cabeza del equino (ver Foto 3)
- Cable de sensor de temperatura y presión ambiental con un rango de 0° a 40° C y presión barométrica de 400 a 1200 mbar.

- Cardiotacómetro telemétrico marca Polar, para monitorear la frecuencia cardíaca durante el ejercicio. Peso de 200 grs, con una longitud de 112 mm, un ancho de 60 mm y un espesor de 48 mm, frecuencia de 430 a 470 MHz, con un rango de alcance de hasta 2 metros.
- Cable marcador, para marcar eventos específicos durante el protocolo de trabajo.
- Cable para conectar a la PC, desde el sistema de base.
- PC Pentium IV.
- Programa MetaSoft Vet Metabolic Stress.



Foto 2.2. Mascara nasal con sistema de acople caudal para mantener cerrado el circuito.



Foto 2.3. Sensor de flujo volumen acoplado a sistema Meta Vet.



Foto 2.4. Sensor de flujo volumen acoplado la máscara nasal colocado en el animal, preparado para subir a la cinta.

Este equipo permite determinar los siguientes parámetros:

- Volumen Tidal (VT): es la cantidad de aire que el caballo inhala y exhala durante una respiración normal. Los equinos mueven una columna de aire de 8 – 12 ml/kg. Un caballo de 500 kgs. Tiene un (VT) de 6000 ml aproximadamente, pudiendo éste alcanzar hasta el 50% de la capacidad vital en esfuerzo máximos. El aumento del VT de forma moderada es a expensas del VRI, cuando el aumento es muy alto esto es por modificaciones del VRI y VRE.
- Volumen inspirado (VI): es la cantidad de aire en litros que puede inhalar un equino por cada ciclo respiratorio.
- Frecuencia respiratoria (Fr): es la cantidad de movimientos respiratorios por unidad de tiempo (8-16 mov/min). Durante los ejercicios de máxima intensidad la (Fr) puede llegar a alcanzar valores que estén 12 veces por encima de los de reposo.
- Volumen minuto respiratorio (VE): es el volumen de aire que el caballo inhala y exhala en un minuto, este se puede obtener multiplicando la frecuencia respiratoria por el (VT). Todas las especies mueven en reposo una columna de aire promedio de 170 ml/Kg./min.
- Flujo de pico de aire (Peak flow): es la cantidad máxima de aire que puede inhalar o exhalar en un segundo.

- Consumo de oxígeno (VO_2): es la cantidad de oxígeno que consume un animal en un minuto y se puede medir en l/min o en ml/Kg/min. En reposo, los equinos consumen unos 3.5 ml/kg/min denominado un MET (unidad metabólica), durante el ejercicio este consumo de oxígeno puede aumentar en función de la capacidad aeróbica de cada animal, en el hombre hasta 20 veces, en los equinos hasta 60 veces y a ese valor máximo se lo denomina consumo máximo de oxígeno (VO_2 max). El registro se realiza en ambas condiciones a) "*Body temperature pressure saturated*" (BTPS) donde el análisis se realiza en presencia de vapor de agua ó b) "*Standar temperature pressure and dry*" (STPD) esto corresponde a una situación de 0°C de temperatura, presión de 760 mmHg al nivel del mar en condiciones de ausencia de vapor de agua (seco).
- Déficit de oxígeno: Déficit de O_2 máximo acumulado: (DOMA) es la falta total de O_2 que ocurre al comienzo del ejercicio a intensidades máximas, generando una inadecuada producción de energía por la vía aeróbica. En forma matemática sería la diferencia entre la demanda de O_2 y el consumo de O_2 actual. La demanda de oxígeno es calculada por una extrapolación de la relación lineal entre el consumo de oxígeno y la velocidad a intensidades submáximas (Figura 2.1.).
- Deuda de oxígeno: en inglés "Oxygen Debt" (OD). Es el período de la recuperación en donde se restaura todo el déficit metabólico producido durante el ejercicio. En este período se restablece la lactacidemia, las

catecolaminas, la concentración de oxígeno en la mioglobina, el ATP muscular, etc. (Figura 2.1.)

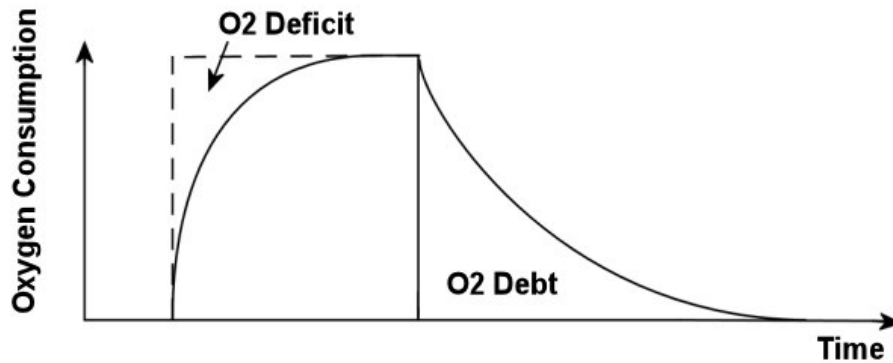


Figura.2.1. Curva de Deuda y Déficit de Oxígeno.

- Producción de dióxido de carbono (VCO_2) – (BTPS – STPD): es la cantidad de dióxido de carbono que produce un animal y se puede medir en litros/min o ml/Kg/min. Esta puede proceder de dos orígenes: 1) Como producto final de todos los sustratos energéticos junto con el agua (H_2O). 2) Por el efecto buffer del bicarbonato (HCO_3) con el ácido láctico, dando como producto final CO_2 y H_2O .
- Cociente respiratorio (RER.): del inglés “Respiratory Exchange Ratio” es la relación que existe entre el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono. Es indicativo del principal sustrato energético que está utilizando el animal. Con un metabolismo mixto (hidratos de carbonos, lípidos, proteínas) el R está alrededor de 0.8. Cuando el metabolismo es principalmente de hidratos de carbono el valor de R se aproxima a 1 o lo supera (si lo supera es

que hay anaerobiosis), mientras que con un metabolismo mayoritariamente lipídico el valor de R es cercano a 0.7.

- Fracción inspirada de oxígeno (FIO_2): Es el porcentaje de oxígeno que hay en el aire atmosférico (entre el 19 y el 21%).
- Fracción inspirada de dióxido de carbono ($FICO_2$): Es el porcentaje de dióxido de carbono que hay en el aire atmosférico (entre el 0.5 y el 1%).
- Fracción espirada de oxígeno (FEO_2): es la cantidad de oxígeno expresado en porcentaje exhalada en cada espiración.
- Fracción espirada de dióxido de carbono ($FECO_2$): es la cantidad de dióxido de carbono expresado en porcentaje, exhalada en cada espiración.
- Equivalente ventilatorio para el oxígeno (VE/VO_2): es la relación que existe entre los litros de aire ventilado y los litros de oxígeno consumidos. Este parámetro es utilizado para evaluar la eficacia ventilatoria, debido a que cuanto menor es el VE/VO_2 este animal tendrá una mayor eficiencia ventilatoria.
- Equivalente ventilatorio para el dióxido de carbono (VE/VCO_2): es la relación que existe entre los litros de aire ventilado y los litros de dióxido de carbono producidos.

- Frecuencia Cardíaca (Fc): es la cantidad de movimientos cardíacos por unidad de tiempo (minuto), que para el equino tiene valores entre 28 y 40 lat/min. en reposo. Durante el ejercicio esta puede aumentar hasta 7 veces.
- Pulso de oxígeno (PO): es el cociente entre el VO_2 y la Fc. Nos indica la cantidad de oxígeno que se consume por cada ciclo cardíaco.
- Temperatura ambiental (TA): se considera a la temperatura presente en el ambiente donde se lleva a cabo el experimento. Se registra en grados centígrados.
- Temperatura de flujo (TF): es la temperatura del flujo de aire espirado a nivel de los ollares. Se expresa en grados centígrados. Nos permite evaluar la funcionalidad termorreguladora del aparato respiratorio, en condiciones fisiológicas la temperatura del flujo de aire no se modifica más de 0.5 °C. Es importante el efecto termorregulador del aparato respiratorio porque la presión de saturación de vapor de H_2O (P_{SVH_2O}) es dependiente de la temperatura corporal y no de las presiones de los otros gases. A 37.5 °C la P_{SVH_2O} es de 47 mmHg.
- Presión Barométrica (PB): es la presión que ejerce la atmósfera sobre la tierra. Se registra en mbar o mmHg.

Si bien fueron registradas durante los SET muchas de las variables presentadas para este estudio en particular se tuvo en cuenta el Consumo de Oxígeno (VO_2).



Foto 2.5. Sistema de ergo-espirometría en marcha con el equino sobre la cinta.



Foto 2.6. Registro en PC de variables espirométricas.

2.1.4. Toma de muestras sanguíneas

Se tomaron dos tipos de muestras. Un primer grupo destinado a la determinación de daño en el ADN, peroxidación de lípidos de membrana, hematocrito y lactacidemia, las cuales se extrajeron durante el desarrollo de cada SET. Y un segundo grupo de muestras destinadas a la determinación de las concentraciones de urea y creatina fosfoquinasa (CPK) plasmáticas antes y después de cada SET.

Para las muestras obtenidas durante el test de ejercicio los equinos fueron canalizados, previa preparación aséptica de la piel, en la vena yugular derecha (foto 9) con un catéter N° 14 marca adbo catt, el cual fue fijado a la piel con un punto de sutura. El catéter se conectó a un prolongador cristal (foto 7) el cual fue recubierto con una cinta aisladora negra (foto 8) para evitar la incidencia de la luz con la muestra dado que la luz produce un aumento en la fragmentación del ADN (Picco S.J. 2004). La vía fue heparinizada con solución fisiológica conteniendo 5UI de heparina por ml de solución. Esta maniobra fue realizada previa al SET.



Foto 2.7. Prolongador cristal.

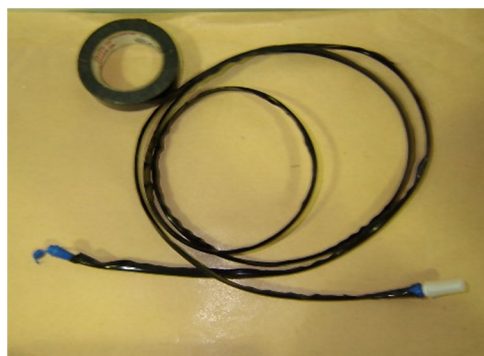


Foto 2.8. Prolongador cristal, recubierto con cinta aisladora negra para prevenir daño de ADN por luz.



Foto 2.9. Equino canalizado en yugular derecha y con mascara y sensor colocados preparado para realizar el SET.

Las muestras obtenidas para la determinación de uremia y CPK se obtuvieron por punción de vena yugular izquierda con jeringa de 20 ml y aguja calibre 18 G estériles previa preparación aséptica de la piel.

2.1.4.1. Tiempos de toma de muestra de sangre venosa

Las muestras de sangre obtenidas durante el SET se tomaron: inmediatamente antes del inicio del SET (T_0 = basal), al momento de alcanzar el punto de fatiga (T_1 = fatiga), a los 5 minutos de haber finalizado el esfuerzo (T_2 = recuperación) y 30 días luego de realizado el test de ejercicio (T_3 = post 30). Las muestras obtenidas para la determinación de urea y CPK se tomaron previo al SET (T_0 = basal), a las 12 horas y a las 24 horas post ejercicio.

2.1.4.2. Procedimiento para la extracción

Para la extracción de cada muestra de sangre durante el SET se procedió de la siguiente manera:

- 1°. Extracción con una jeringa de 20 ml de la solución heparinizada que se encuentra en el prolongador hasta la obtención de sangre venosa pura. Esta muestra denominada “sucia” se descarta.

- 2°. Extracción de una segunda muestra de 15 ml de sangre venosa, con una jeringa de 20 ml estéril sin anticoagulante para su posterior procesamiento. Dicha muestra durante el test se extrajo 10 segundos antes de la finalización de cada etapa de ejercicio.

3°. Administración en el prolongador de 20 ml de la solución heparinizada (5UI/ml) para mantener la vía permeable.



Foto 2.10. Extracción de sangre venosa durante máxima velocidad sobre cinta ergométrica.



Foto 2.11. Sub división de la muestra de sangre para diferentes determinaciones.

2.1.4.3. Procesamiento de las muestras de sangre

Cada muestra de sangre obtenida durante el SET fue dividida en 4 sub muestras según se describe debajo, descartando el excedente:

- 5 ml de sangre en tubo con heparina de litio para evaluar daño de ADN en leucocitos circulantes que se mantuvieron refrigerados y protegidas de la luz hasta su procesamiento para ensayo cometa.
- 5 ml de sangre en tubo con heparina de Na⁺ para evaluación de peroxidación y composición de lípidos de membrana de glóbulos rojos que se mantuvieron refrigerados hasta el posterior análisis.
- 0,5 ml de sangre en tubo con heparina de Na⁺ para evaluación de hematocrito.
- 0,5 ml de sangre para evaluación de niveles de ácido láctico sanguíneo.

Las muestras obtenidas para la determinación de urea y CPK fueron refrigeradas y acondicionadas para su envío al Laboratorio Central del Hospital Escuela de la FCVUNLP para su procesamiento.

2.1.5. Determinación del daño en el ADN en leucocitos de sangre periférica mediante el empleo del ensayo cometa (comet assay) versión alcalina

Diferentes técnicas han sido utilizadas para el análisis in vivo, e in vitro del daño oxidativo del ADN, pero en la actualidad las más utilizadas son la medición del 8-OHdG (8-hydroxydesoxyguanosine) y el análisis COMETA (comet assay) (Marlin D. y col. 2004).

El análisis cometa, también llamado técnica unicelular de electroforesis en gel de células aisladas (single-cell gel electrophoresis technique), es un método simple, sensitivo y rápido que puede ser utilizado para estimar el daño del ADN de la célula a nivel individual a través de la detección de rupturas de simple y doble cadena, sitios lábiles al álcali y sitios de reparación tardía en la molécula de ADN (Singh N. P. y col. 1988; Hartmann A. y col. 2003). En la actualidad existen numerosas versiones, las cuales generalmente pueden diferenciarse por variaciones menores en aspectos de procedimiento, permitiendo sin embargo distinguir dos tipos de ensayo: el ensayo cometa “versión neutra”, cuya principal característica es el lisado de las células en condiciones de pH neutro, utilizado para la detección de rupturas de doble cadena en la molécula de ADN y el ensayo cometa “versión alcalina”, de mayor aceptación y difusión, en la cual la lisis celular se realiza en condiciones de pH generalmente > a 12.

El ensayo trabaja con el principio de que los radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ROS) causan ruptura en el ADN y/u oxidación de bases. Las células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cell (PBMC)) son los tipos celulares más frecuentemente utilizados en el ensayo cometa (Marlin D. y col. 2004).

2.1.5.1. Metodología

La determinación del daño en el ADN en leucocitos de sangre periférica se realizó mediante la utilización de la electroforesis en gel de células aisladas (ensayo cometa), versión alcalina, de acuerdo con el protocolo de Singh y col. (1988), con pequeñas modificaciones. Este ensayo fue llevado a cabo en las instalaciones del Instituto de Genética Veterinaria (IGVET) de la FCV-UNLP.

Las muestras de sangre fueron refrigeradas y colocadas en oscuridad inmediatamente después de obtenidas y se procesaron en el transcurso de los treinta minutos siguientes a la toma. De cada muestra de sangre entera se tomaron 15 μ l, los que se re suspendieron en 85 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (0,5%) a 37°C. Luego la suspensión se montó sobre portaobjetos cubiertos con 200 μ l de agarosa de punto de fusión normal (0,5%). Una vez sobre el portaobjetos la suspensión se cubrió con un cubreobjetos y se enfrió en heladera durante 10 minutos hasta su solidificación. Se retiró el cubreobjetos y el portaobjetos se colocó en solución de lisis (EDTA 200 mM, ClNa 2,5 M, Tris 10 mM, Triton X-100 al 1% y DMSO al 10%) durante un tiempo no menor a 1 hora. Finalizada la etapa de lisis los portaobjetos se colocaron en una cuba de electroforesis horizontal y se cubrieron con una solución cuyo objetivo es la

desespiralización de la molécula del ADN (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH > 13) durante 20 minutos. La electroforesis se realizó con los portaobjetos inmersos en esta solución, a 25 V y 300 mA (1,25V/cm) durante 30 minutos y en completa oscuridad. Una vez finalizada la electroforesis las preparaciones fueron neutralizadas tres veces, a intervalos de 5 minutos, con una solución de Tris-HCl 0,4 M a pH 7,5 y finalmente lavadas con agua destilada. Una vez secadas en incubadora, las preparaciones se tiñeron con una solución de SYBR Green I al 1/1000 y analizadas con un microscopio Olympus BX 40 provisto de una lámpara de mercurio de alta presión de 100 W (USHIO USH 102 D). Se analizaron 100 células por punto experimental, que fueron captadas con una cámara CCD Sony y capturadas con el software Image Pro Plus®. En primera instancia se determinó la presencia o ausencia de migración en el ADN como indicador de células con o sin daño en el ADN. A partir de esta observación se obtuvo la frecuencia de células con daño (FCD). En segunda instancia las células se clasificaron según niveles de daño, donde el grado 1 representa ausencia de migración detectable en el ADN, en el grado 2 se observa un pequeño desplazamiento de ADN hacia el ánodo, en el grado 3 el ADN fragmentado adquiere la forma de una cola de cometa, pero su extensión es menor o igual a la extensión de la cabeza (núcleo), en el grado 4 la imagen adquiere un claro aspecto de cometa, mientras que el grado 5 representa el máximo nivel de fragmentación del ADN y la figura resultante es la de un cometa pero con disminución marcada del diámetro de la cabeza (Marlin D. y col. 2004). El cálculo de índice de daño (DDV: del inglés DNA damage value) se realizó de acuerdo a la metodología planteada por Collins (2004) en el cual se establecen unidades arbitrarias de daño.

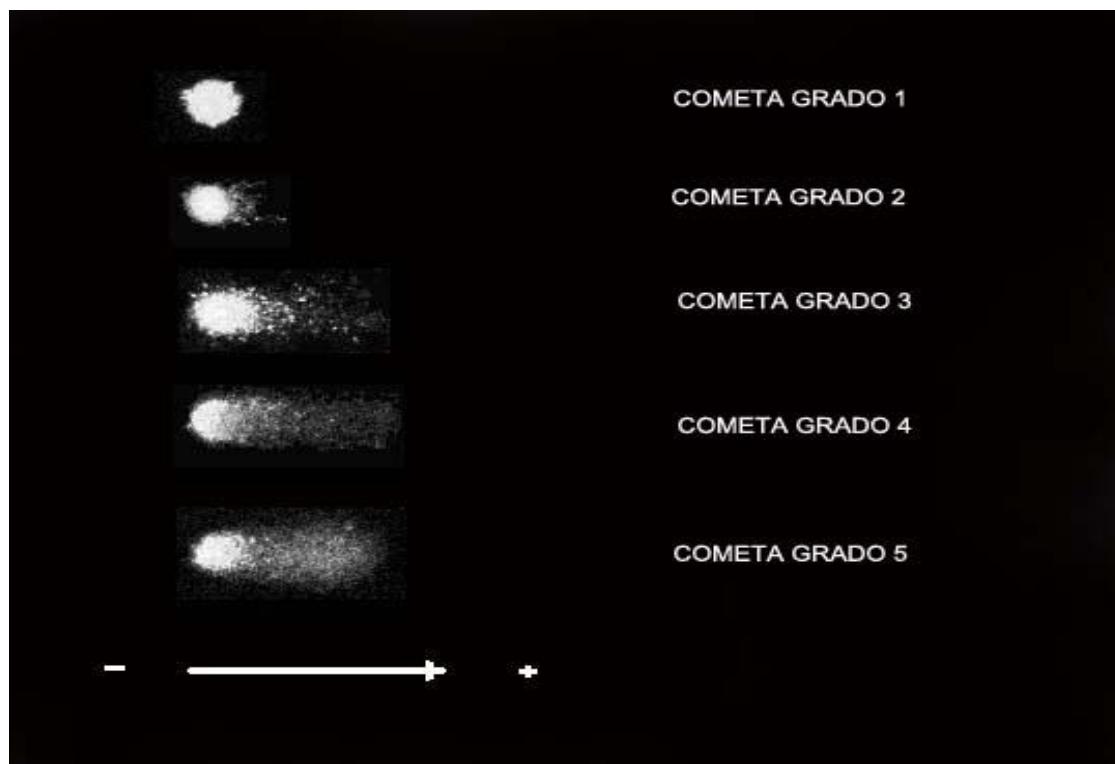


Figura 2.1. Esquema óptico de clasificación del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica.

2.1.6. Determinación de la concentración de lactato en sangre

Este es un método invasivo pero es el más preciso para realizar estudios a campo ya que determina con exactitud que concentración de lactato hay en sangre a cada velocidad de carrera. Cuando se realiza esta medición se debe tener en cuenta si se hace en sangre entera o en plasma, debido a que la sangre entera tiene un 30% más de capacidad buffer que el plasma. En este trabajo se utilizó sangre entera para la evaluación de la concentración de lactato.

Para la determinación de la concentración de lactato en sangre se utilizó el denominado método seco. La concentración sanguínea de lactato fue medida inmediatamente después de tomada cada muestra mediante la colocación de una gota de sangre capilar en un equipo portátil de lectura rápida marca Accusport®.

El equipo mide lactato de acuerdo al principio de determinación enzimática por reflexión fotométrica, empleando una longitud de onda de 660 nm, en un tiempo de 60" por dato expresado en milimoles por litro (mmol/ l), con un rango de medición en sangre de 0.8 a 22 mmol/l y en plasma 0.7 a 27 mmol/l.

Las tiras para lectura tienen una longitud de 46 mm x 6 mm y constan de cuatro capas, la primera donde se deposita la sangre entera, la siguiente es de fibra de vidrio y separa las células rojas, la tercera capa o fase donde ocurren las mediciones en el plasma, y una cuarta capa que sirve de soporte a las otras tres.

2.1.6.1. Metodología

Una vez calibrada la maquina con la tira testigo se levanta la tapa y se introduce una tira nueva, se espera unos segundos a que sea reconocida por la lectora y se procede a descargar una gota de sangre sobre el sitio destinado para tal fin sobre la tira, acto seguido se procede a cerrar la tapa y esperar 60 segundos para la lectura del resultado en el monitor.



Foto.2.12. Colocación de muestra sanguínea en Acussport para medición de lactato.



Foto.2.13. Lectura de nivel de lactato sanguíneo.

2.1.7. Determinación de la peroxidación de lípidos de membrana y composición de ácidos grasos de glóbulos rojos de sangre periférica

Se evaluó el daño producido por la generación de radicales libres en la peroxidación de lípidos de membrana de los glóbulos rojos de todos los equinos, sometidos al SET mediante el análisis por quimioluminiscencia, y el análisis de la composición de lípidos de membrana por cromatografía descritos por Iglesias B. F y col. 2004, en las instalaciones de la Cátedra de bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.L.P.

2.1.7.1. Preparación de los eritrocitos:

Los eritrocitos fueron separados del resto de los componentes sanguíneos por centrifugación (1000 g por 10 min. a 4 °C) en centrifuga refrigerada marca Kubota 6800. El plasma y el resto de los componentes formes se descartaron, y los eritrocitos fueron lavados tres veces en buffer fosfato isotónico (PBS 5 mM; pH 7,4; 150 mM NaCl). El concentrado de eritrocitos se suspendió en PBS (Iglesias B. F y col. 2004).



Foto 2.14. Centrifuga refrigerada marca Kubota 6800

2.1.7.2. Obtención de las membranas plasmáticas de los eritrocitos

(fantasmas)

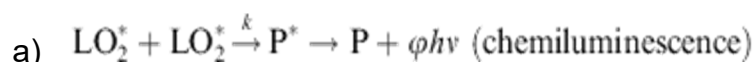
La preparación de las membranas de los eritrocitos (fantasmas) fue llevada a cabo según el método descrito por Doge y col (1963) con modificaciones. Los eritrocitos lavados se lisaron mediante la adición de 10 vol. de buffer 5 mM fosfato pH 7,4 (a 4°C) durante su mezcla. Después de dejar en hielo durante 30 minutos, las membranas de los eritrocitos se concentraron por centrifugación a 20.000g durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante que contiene hemoglobina. Luego las membranas de eritrocitos fueron lavadas tres veces mediante la suspensión en buffer refrigerado (mismo volumen utilizado para la lisis) seguido por centrifugación en las mismas condiciones. Finalmente, las membranas fueron suspendidas en buffer 5 mM isotónico (mismo volumen utilizado para lisis) seguido por centrifugación bajo las mismas condiciones y luego re suspendido en buffer 5 mM fosfato isotónico pH 7,4. Las membranas de los eritrocitos fueron cuantificadas sobre la base de la concentración de proteína usando el ensayo de Lowry y col. (1951).

2.1.7.3. Peroxidación lipídica de fantasmas de eritrocitos analizado por quimioluminiscencia

Los fantasmas obtenidos previamente se incubaron a una concentración final de 0,25 mg / ml de proteína total con 4, 8, 16 y 32 mM de t-BHP de 190 minutos a 37 ° C. Alícuotas idénticas de la preparación de fantasma se incubaron durante 190 min a 37 ° C sin la adición de t- butyl hydroperoxide (t-BHP) como el

experimento control para los productos de peroxidación de lípidos endógenos en la preparación fantasmas de eritrocitos. La peroxidación lipídica se inició mediante la adición de una pequeña cantidad de solución madre de hydroperoxide t-butilo (80 mM) a cada vial que se mantuvo a 37 ° C y se midió mediante el control de emisión de luz (Wright y col. 1979) con un contador de centelleo líquido Packard 1900 TR (Fig.2.15.). La quimioluminiscencia se determinó durante un período de 190 min y se registró como recuento por minuto (cpm) cada 12 min. Cada reacción se terminó mediante la adición de 5 ml de cloroformo / metanol (2: 1, v / v) que contiene 0,01% de hidroxitolueno butilado (BHT). Esto también inhibe la oxidación adicional durante la extracción de lípidos (ver más abajo).

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena de ramificación que se puede considerar como teniendo lugar en cuatro etapas principales: (1) iniciación, (2) propagación, (3) ramificación y (4) terminación de cadena. Al menos tres reacciones son conocidas para romper las cadenas: (a) la interacción de los dos radicales que conducen las cadenas, (b) la interacción de un radical con el cambio de valencia del metal, y (c) reacción entre una molécula de un radical y una de "antioxidante".



La reacción (a) es particularmente interesante ya que es acompañada por quimioluminiscencia cuya intensidad (I) puede servir como una medida de la concentración de radicales libres de peróxido (LO_2^*) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I = K\phi k[\text{LO}_2^*]^2$$

Donde ϕ representa el rendimiento cuántico de quimioluminiscencia y K el coeficiente dependiendo de la sensibilidad neta del instrumento. LO^*_2 es un radical libre producido a partir de moléculas de lípidos (Vladimirov y col. 1980).



Foto 2.15. Contador de centelleo líquido Packard 1900 TR.

2.1.7.4. Composición de ácidos grasos de membrana de eritrocitos por cromatografía

Los lípidos peroxidados a partir de muestras en presencia o en ausencia de t-BHP se extrajeron con cloroformo / metanol (2: 1, v / v que contiene 0,01% de BHT como antioxidante) (Folch y col. 1957). Los ácidos grasos de los lípidos totales se transmetilaron con 20% F₃B en metanol a 65 ° C durante 180 min. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se analizaron con un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14A (Kyoto, Japón) equipado con una columna de relleno (1,80 m × 4 mm de diámetro) (J. y V. Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) (Fig. 2.16). GP 10% DEGS-PS 80/100 Supelcoport. Se utilizó nitrógeno como gas portador. Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 ° C, la temperatura de la columna se mantuvo a 200 ° C durante 60 min. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se identificaron por comparación de los tiempos de retención con

compuestos estándar. Todas las composiciones se expresan en % del área del total de ácidos grasos.



Foto 2.16. Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14A.

El índice de insaturación “Unsaturation Index” (IU) se calculó con la siguiente fórmula: $IU = \text{suma de los porcentajes de ácido graso insaturados} \times \text{número de enlaces dobles}$. (Llanillo y col. 1995).

2.1.8. Determinación del hematocrito

Tras una centrifugación de la sangre total se pueden apreciar dos niveles, uno con el depósito de los glóbulos rojos, principalmente, y otro nivel del plasma total. La relación porcentual entre ambos es lo que describe el hematocrito y describe el porcentaje de células transportadoras de oxígeno con respecto al volumen total de sangre.

Para su determinación se utilizaron tubos capilares para microhematocrito conteniendo heparina los cuales fueron cargados con cada muestra de sangre y sellados con plastilina respectivamente, y luego colocados en una microcentrifuga marca Rolco modelo CH 24, y centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se procedio a su lectura en Abaco.

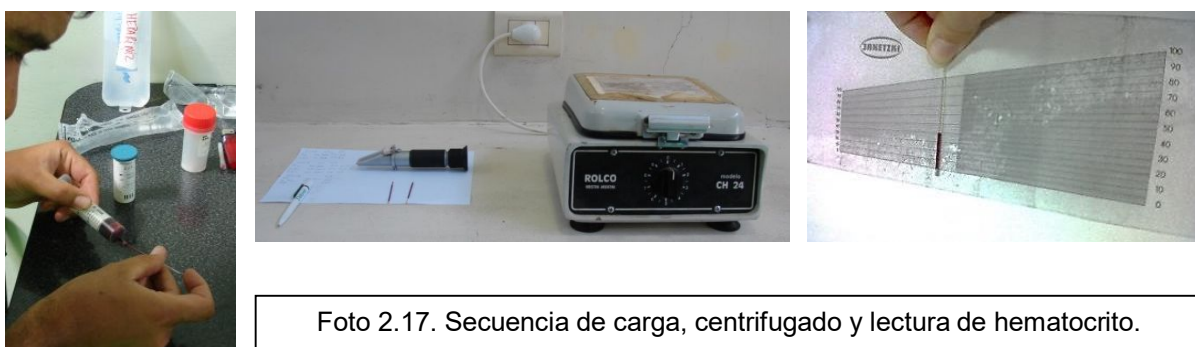


Foto 2.17. Secuencia de carga, centrifugado y lectura de hematocrito.

2.1.9. Determinación de urea sanguinea

La urea constituye la fracción de nitrógeno no proteico más importante en la mayoría de los líquidos biológicos. En el hombre es el principal producto final del metabolismo proteico. Se produce en el hígado y es excretada por la orina a través de los riñones. Una elevación de la concentración sérica de urea, se interpreta generalmente como una posible disfunción renal. Sin embargo, no debe dejarse de lado el hecho de que los valores séricos de urea se encuentran íntimamente relacionados con la dieta y el metabolismo proteico, por lo que cualquier alteración en estas variables se traducirá en un cambio de la concentración de urea en suero. El método de determinación se basa en que al producirse la hidrólisis de la urea, la ureasa descompone a ésta produciendo

dióxido de carbono y amoníaco. Este último reacciona en medio alcalino con salicilato e hipoclorito para dar indofenol de color verde.

2.1.9.1. Materiales y técnica de determinación

- Suero recogido mediante procedimientos estándar.
- Espectrofotómetro o fotocolorímetro marca Metrolab 1600 DR.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Baño termostático a 37°C.
- Kit Urea 2R marca Wiener Lab para determinación manual.

Reactivo Urea 2R:

1. Reactivo A: solución concentrada que contienen fosfatos buffer de 200 mmol / l, ácido salicílico 750 mmol / l, nitroprusiato de sodio 20 mmol / l y EDTA 10 mmol / l.

2. Reactivo B: solución concentrada 10 mmol / l de hipoclorito de sodio en 0,1 mol / l de hidróxido de sodio.

3. Reactivo C: ureasa ≥ 75 U / ml en solución glicerizada.

Standard: solución de 0,60 g / l de urea (28,4 mg / dl BUN).

4. Agua destilada.

Técnica:

En tres tubos marcados B (Blanco), D (Desconocido) y S (Standard) colocar:

	B	S	D
Standard	-	10 ul	-
Suero o plasma	-	-	10 ul
Reactivo A+C	1 ml	1 ml	1 ml
Mezclar. Incubar 5 minutos a 37 °C o 10 minutos a temperatura ambiente. Luego agregar:			
Reactivo B	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar. Incubar 5 minutos a 37°C o 10 minutos a temperatura ambiente.

Leer en espectrofotómetro a 570 nm o en fotocolorímetro con filtro naranja (560-580 nm).

0,60 g/l

Calculo de resultados: Urea g/l = D x factor Factor = $\frac{\text{-----}}{\text{S}}$

2.1.10. Determinación de CPK

La CPK desempeña una importante función en el músculo proporcionando ATP, cuando el músculo se contrae, a partir de ADP y utilizando creatina fosfato como reservorio de fosforilación.

La CPK sérica procede fundamentalmente del músculo y su concentración depende de una serie de variables fisiológicas (sexo, edad, masa muscular, actividad física y raza). La concentración sérica de CPK se encuentra notablemente elevada en pacientes con algunas de las enfermedades del músculo esquelético, del sistema nervioso central y de la tiroides.

La determinación se basa en que la CPK cataliza la fosforilación del ADP por el fosfato de creatina, obteniéndose creatina y ATP. La concentración

catalítica se determina, empleando las reacciones acopladas de la hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, a partir de la velocidad de formación del NADPH, medido a 340 nm.

2.1.10.1. Materiales y técnica de determinación

- Suero recogido mediante procedimientos estándar.
- Espectrofotómetro o fotocolorímetro marca Metrolab 1600 DR.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Baño de agua a 37°C (opcional).
- Reactivo Creatina Quinasa (CK) IFCC Biosystems.

Reactivo CK IFCC:

Reactivo A: Imidazol 125 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, acetato de magnesio 12,5 mmol/L, D-glucosa 25 mmol/L, N-acetilcisteína 25 mmol/L, hexoquinasa 6000 U/L, NADP 2,4 mmol/L, pH 6,7.

Reactivo B: Fosfato de creatina 250 mmol/L, ADP 15 mmol/L, AMP 25 mmol/L, P₁, P₅-di (adenosina-5'-) pentafofato 102 µmol/L, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 8000 U/L.

Preparación de los reactivos:

Reactivo de Trabajo: Añadir el contenido de un frasco del Reactivo B a un frasco del Reactivo A. Mezclar suavemente. Si se desea preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 4 mL de Reactivo A + 1 mL de Reactivo B. Estable 15 días a 2-8°C. El reactivo de trabajo se ha de proteger de la luz.

Procedimiento:

1. Precalentar el Reactivo de Trabajo y el instrumento a la temperatura de reacción.
2. Pipetear en una cubeta:
 - Muestra 50 μ L
 - Reactivo de Trabajo 1,0 mL
3. Mezclar e insertar la cubeta en el fotómetro. Poner el cronómetro en marcha.
4. A los 3 minutos, anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
5. Calcular el incremento de absorbancia por minuto promedio ($\Delta A/\text{min}$).

La concentración de CPK en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\Delta A/\text{min} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s} = \text{U/L}$$

El coeficiente de absorción molar (ϵ) del NADPH a 340 nm es 6.300, el paso de luz (l) es 1 cm, el volumen total de reacción (V_t) es 1,05, el volumen de muestra (V_s) es 0,05, y 1 U/L equivale a 16,67 nkat/L. Se deducen los siguientes factores para calcular la concentración catalítica:

$\Delta A/\text{min}$	$\times 3333 = \text{U/L}$ $\times 55561 = \text{nkatal/L}$
-----------------------	--

2.2. EXPERIMENTO 2:

En este bloque los animales fueron utilizados exclusivamente para establecer la cinética del daño del ADN en leucocitos de sangre periférica y su asociación con los niveles de lactato en sangre y consumo máximo de oxígeno. La metodología utilizada corresponde a la descrita en los apartados: 2.1.3; 2.1.4; 2.1.5 y 2.1.6.

2.2.1. Animales experimentales

Se utilizaron 7 equinos SPC, con un excelente estado nutricional y de salud. Estos fueron alojados en boxes del Hospital Escuela y del Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata durante todo el período de ensayo. Los animales se alimentaron en base a un 2,5% del peso corporal de materia seca. La dieta presentaba una relación 50:50 de heno (rollo de pastura) y concentrado (alimento balanceado con un 12% de proteína y 2,75 Mcal/Kg), y agua ad-libitum.

Tabla 2.2. Características de los equinos utilizados en experimento 2.

Caballos (Número)	Raza	Alzada (cm)	Edad	Peso (kg)
1	SPC	159	6	435
2	SPC	162	6	428
3	SPC	162	9	432
4	SPC	160	5	440

5	SPC	162	7	438
6	SPC	159	8	436
7	SPC	165	4	440

2.2.2. Test de ejercicio estandarizado

Corresponde a la misma utilizada en el Experimento 1. Ver referencia 2.1.2.

2.2.2.1. Protocolo de ejercicio

El segundo SET se realizó de la siguiente manera: una fase de precalentamiento 1 min. a 1.7 m/s, 4 min. a 4 m/s, 1 min. a 6.5 m/s, 1 min. a 8.5 m/s, 1 min. a 10.5 m/s, 1 min. a 12.5 m/s, 2 min. a 15 m/s, 4 min. a 4 m/s, y 1 min. a 1.7 m/s, respectivamente. Todo el test se desarrolló con una inclinación del 3 %.

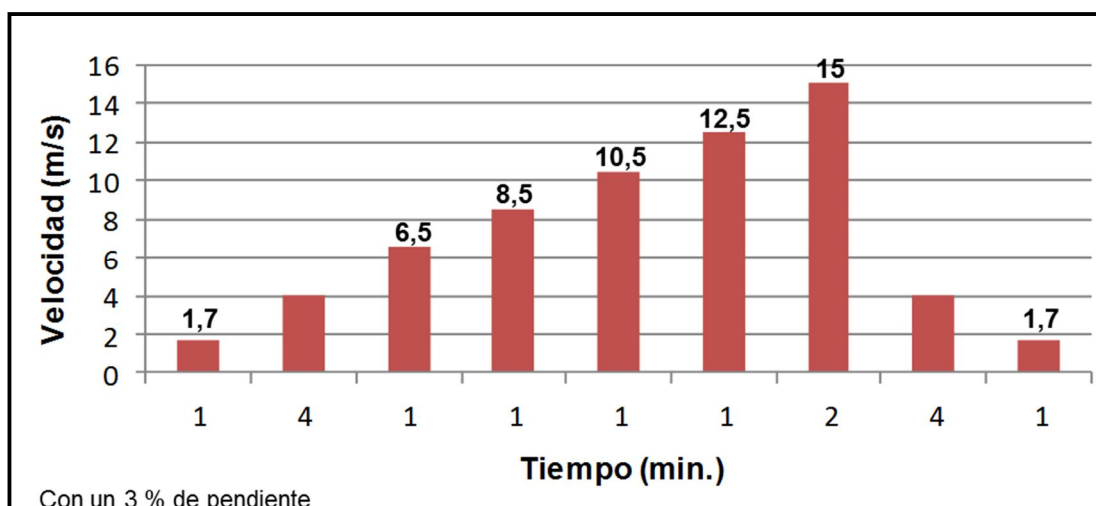


Figura 2.2. Protocolo de ejercicio incremental implementado en el experimento 2.

2.2.3. Ergo espirometría

Corresponde a la misma utilizada en el Experimento 1. Ver referencia 2.1.3.

2.2.4. Toma de muestras sanguíneas

Corresponde a la misma utilizada en el Experimento 1. Ver referencia 2.1.4.

2.2.4.1. Tiempo de toma de muestras

Para este experimento se obtuvieron muestras de los animales en reposo (T_0 =basal), durante el test de ejercicio a los 8.5 m/s (T_1) y 15 m/s (T_2), 5 min. (T_3) y 30 min (T_4) post ejercicio respectivamente y 30 días luego de realizado el esfuerzo (T_5).

2.3. Analisis de los datos

Las frecuencias de células normales y anormales en cada tiempo de muestreo fueron comparadas utilizando el test de Chi cuadrado con corrección de Yates. La cantidad de células con los diferentes niveles de daño en el ADN en cada tiempo de muestreo y el índice de daño fueron comparados utilizando el test t de Student's (SSPS® Versión 11), asumiendo una sola cola de distribución y varianzas iguales entre muestras. Las variaciones en la composición de ácidos grasos de membrana eritrocitarios, la relación entre ácidos grasos saturados e insaturados, el índice de insaturación y las variaciones de quimioluminiscencia

fueron comparados utilizando el test t de Student's (SSPS® Versión 11), asumiendo una sola cola de distribución y varianzas iguales entre muestras. La asociación entre células con daño o índice de daño con el consumo de oxígeno y concentraciones de lactato en sangre, así como las asociaciones entre estas variables y CPK y Urea se realizaron a través del coeficiente de correlación y R (Pearson) ajustado. Los resultados se expresaron como la media \pm DS.

Equino 1	90 (±1,63)	10 (±0,81)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	10 (±0,813)	10 (±1,63)
Equino 2	89 (±0,81)	11 (±0,813)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	11 (±0,81)	11 (±0,813)
Equino 3	90 (±0,81)	10 (±1,63)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	10 (±0,813)	10 (±0,81)
Equino 4	92 (±0,81)	7 (±0,816)	1 (±1,41)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	9 (±2,94)	8 (±1,63)
Equino 5	90 (±0,81)	9 (±0,816)	1 (±0,81)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	11 (±2,44)	10 (±1,63)
Equino 6	82 (±1,63)	18 (±0,816)	0 (±1,41)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	18 (±2,94)	18 (±1,63)
Equino 7	85 (±1,63)	15 (±0,816)	0 (±1,41)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	15 (±0,813)	15 (±1,63)

*Índice de daño en el ADN; *¹Frecuencia de células con daño en el ADN

Tabla 3.2. Resultados obtenidos con el ensayo cometa durante T1 (N= 7; 4 repeticiones).

	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	DDV* (UA)	FCD*¹ %
Equino 1	68 (±1,63)	30 (±1,63)	1 (±0,81)	0 (±0,00)	1 (±0,816)	36 (±1,63)	32 (±1,63)
Equino 2	68 (±0,81)	29 (±0,813)	3 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	35 (±0,81)	32 (±0,813)
Equino 3	83 (±0,81)	16 (±0,816)	1 (±0,81)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	18 (±0,813)	17 (±0,816)
Equino 4	79 (±0,81)	19 (±0,816)	1 (±1,41)	0 (±0,00)	1 (±0,00)	25 (±3,55)	21 (±2,16,63)
Equino 5	79 (±0,81)	16 (±0,816)	1 (±0,81)	2 (±1,63)	2 (±1,63)	32 (±0,816)	21 (±1,63)
Equino 6	86 (±0,813)	14 (±1,63)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	14 (±1,63)	14 (±1,63)
Equino 7	79 (±0,813)	19 (±1,63)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	2 (±0,00)	26 (±1,63)	21 (±1,63)

*Índice de daño en el ADN expresado en Unidades Arbitrarias; *¹ Frecuencia de células con daño en el ADN expresado en porcentaje.

Tabla 3.3. Resultados obtenidos con el ensayo cometa durante T2 (N= 7; 4 repeticiones).

	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	DDV* (UA)	FCD*¹ %
Equino 1	69 (±0,81)	27 (±0,816)	4 (±0,81)	0 (±0,00)	0 (±0,816)	35 (±1,41)	31 (±0,81)
Equino 2	87 (±0,81)	12 (±0,813)	1 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	14 (±2,44)	13 (±1,63)
Equino 3	79 (±0,81)	19 (±0,816)	2 (±0,81)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	23 (±2,44)	21 (±1,63)
Equino 4	79 (±0,81)	18 (±0,816)	1 (±0,81)	1 (±0,81)	1 (±0,81)	27 (±8,16)	21 (±3,26)
Equino 5	90 (±0,81)	10 (±0,816)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	10 (±0,816)	10 (±0,81)
Equino 6	83 (±0,813)	17 (±0,81)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	17 (±0,81)	17 (±0,81)
Equino 7	79 (±0,813)	18 (±0,81)	2 (±0,00)	1 (±0,00)	0 (±0,00)	25 (±0,81)	21 (±1,63)

*Índice de daño en el ADN; *¹Frecuencia de células con daño en el ADN

Tabla 3.4. Resultados generales obtenidos con el ensayo cometa durante T0, T1 y T2 (N= 7; 4 repeticiones).

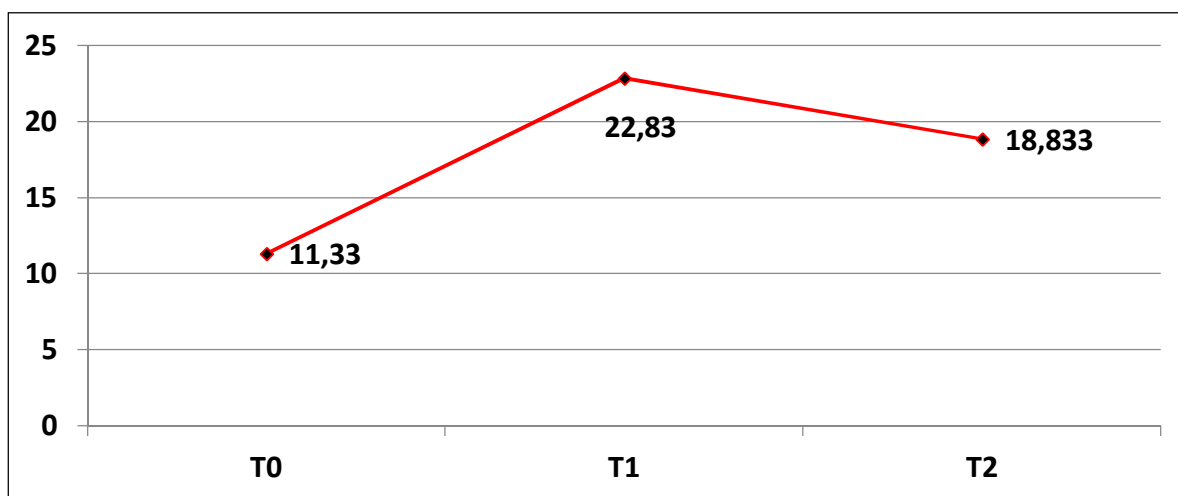
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	DDV* (UA)	FCD*¹ (%)
T0	88,667 ^a (±3,44)	11,000 ^a (±3,74)	0,333 ^{a,c} (±0,516)	0,000 (±0,00)	0,000 (±0,00)	11,667 (±3,2)	11,333 ^a (±3,445)
T1	77,167 ^b (±7,57)	20,667 ^b (±7,033)	1,167 ^b (±0,983)	0,333 (±0,816)	0,667 (±0,816)	26,667 (±9,2)	22,833 ^b (±7,57)
T2	81,167 ^b (±7,387)	17,167 ^b (±5,981)	1,333 ^{b,c} (±1,506)	0,167 (±0,408)	0,167 (±0,408)	21,000 (±9,187)	18,833 ^b (±7,387)

*Índice de daño en el ADN expresado como unidades arbitrarias (UA);

*¹Frecuencia de células con daño en el ADN expresado en %.

Se analizó la frecuencia de células con daño en el ADN (FCD), los grados de daño en el ADN y el índice de daño (DDV: del inglés DNA damage value). La frecuencia basal de células con daño en el ADN fue del 11,33%. Durante el ejercicio se produjo un incremento significativo de dicha frecuencia, alcanzando un valor de **22,83%** ($p= 0,02$). Dicho incremento se mantuvo hasta finalizar el ejercicio, momento en el cual la frecuencia de células dañadas apenas descendió a **18,33%**. Dicho valor fue significativamente mayor que el observado a nivel basal ($p= 0,011$), pero no así del observado en el máximo nivel de ejercicio ($p= 0,437$) (Figura 3.1.).

Figura 3.1. Frecuencia de células con daño (FCD %) en el ADN antes (T0), durante el momento de máximo ejercicio (T1) y luego del ejercicio (T2).



El análisis de los niveles de daño se realiza por apreciación microscópica del nivel de desplazamiento del ADN desde el núcleo celular hacia el polo positivo en una corrida electroforética (Figura 2.1.). El promedio de células sin daño (células grado 1) fue de 88,67% para el caso del T0, siendo significativamente menor para los casos de T1 y T2 (79,42 y 80,14% respectivamente; $p= 0,02$ y $0,011$ respectivamente). No se observaron diferencias entre las frecuencias de células sin daño en T1 y T2 ($p= 0,43$).

El porcentaje de células grado 2, que representa a aquellas células con mínimo nivel de daño, fue de 11% en T0, de 20,67% en T1 y de 17,16 en T2. Los valores observados en T0 fueron significativamente menores a los observados en T1 y T2 ($p= 0,006$ y $0,023$ respectivamente). No se observaron diferencias entre los valores observados para T1 y T2 ($p= 0,187$).

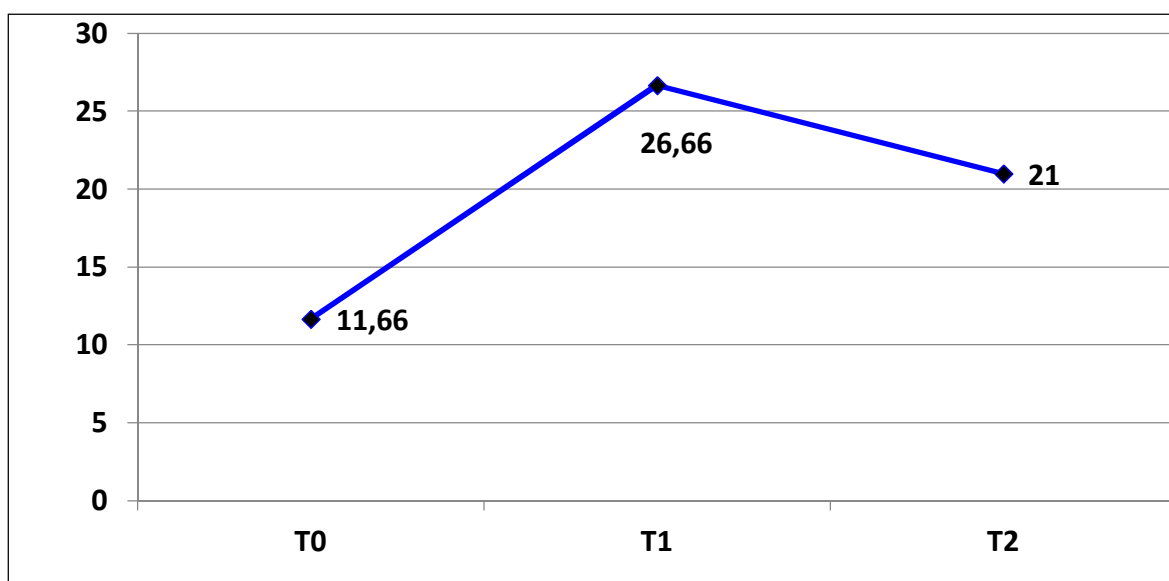
El porcentaje de células grado 3 fue de 0,33% en T0, de 1,167% en T1 y de 1,33 en T2. El porcentaje de células con daño grado 3 fue significativamente

menor entre T0 y T1 ($p= 0,0479$). No se observaron diferencias estadísticas significativas entre T0 y T2 y entre T1 y T2 ($p= 0,077$ y $0,412$ respectivamente).

No se observaron células con altos niveles de daño (grados 4 y 5) en T0. Tomadas globalmente (grado 4 más grado 5), los valores observados para T1 y T2 fueron respectivamente 1 y 0,333%. Los valores obtenidos en T1 fueron significativamente más altos que los observados en T0 ($p= 0,02$). Los valores obtenidos en T2 presentaron una tendencia no significativa a ser mayores que en T0 ($p= 0,07$) y no se diferenciaron de los obtenidos en T1 ($p= 0,103$).

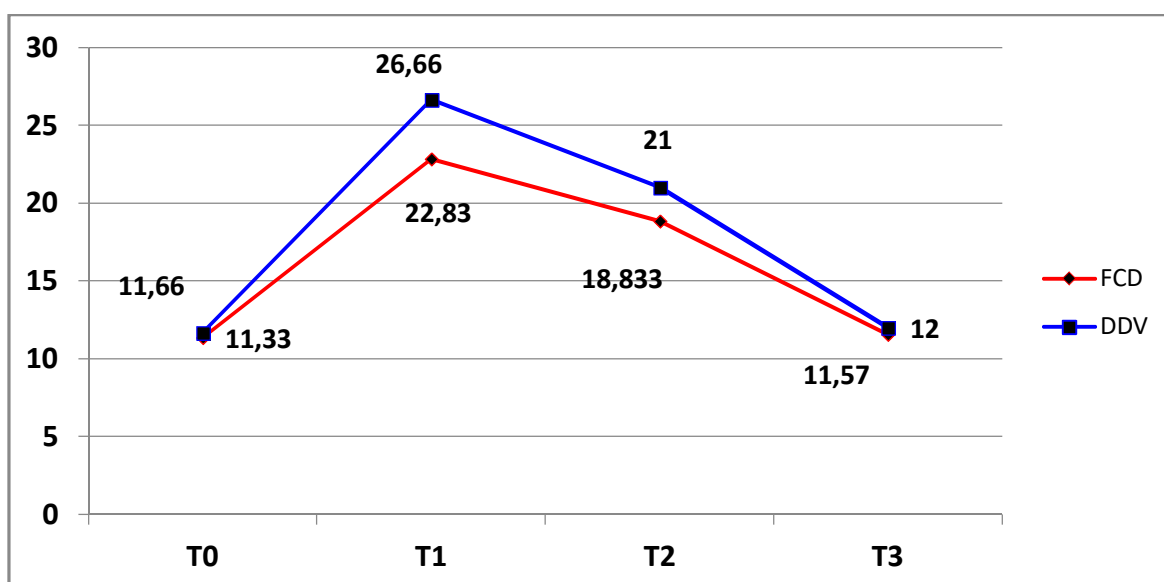
El Índice de daño en el ADN, utilizado para evaluar la intensidad global del daño en el ADN, presento valores de 11,66, 26,66 y 21 para T0, T1 y T2 respectivamente (Figura 3.2.). La intensidad basal de daño en el ADN fue significativamente menor que la observada durante T1 y T2 ($p= 0,001$ y $0,02$ respectivamente). No se observaron diferencias entre la intensidad del daño en T1 y T2 ($p= 0,155$).

Figura 3.2. Variaciones de la intensidad del daño en el ADN (DDV) durante el test de ejercicio (valores medios obtenidos de 7 caballos y 4 repeticiones).



Dado que se utilizaron los mismos animales, es posible especular que los valores iniciales de la segunda, tercera y cuarta repetición representan el valor final de la serie previa de ejercicio. Según este criterio, los valores obtenidos 30 días post ejercicio (en este caso T3) para células grado 1 fueron: 88,42 ($\pm 3,20$); para grado 2: 11,14 ($\pm 3,43$) y para grado 3: 0,43 ($\pm 0,53$). No se observaron células grado 4 y 5: 0 y los valores de DDV y frecuencia de células con daño fueron: 12 ($\pm 3,05$) y 11,57 ($\pm 3,20$) respectivamente. La comparación de estos resultados con los obtenidos en T0, T1 y T2 arrojó la ausencia de diferencias con T0 ($p < 0,05$) y la presencia de diferencias significativas con respecto a T1 y T2 ($p < 0,01$). Según este criterio de análisis, el DDV y la frecuencia de células con daño siguieron el comportamiento presentado en la figura 3.3.

Figura 3.3. Comportamiento del DDV y la frecuencia de células con daño en el ADN (FCD) durante el experimento 1, asumiendo los valores iniciales de los SET 2, 3 y 4 como tiempos T3.



Las principales conclusiones de este experimento fueron que el daño en el ADN se produjo durante el ejercicio y no después del mismo. Dicho daño fue incluso mayor durante el ejercicio que al finalizar el mismo. Esto quedó evidenciado especialmente por la intensidad del daño (DDV), que fue marcadamente mayor (aunque no significativo) en T1 que en T2. La principal diferencia entre los valores obtenidos a nivel basal y los obtenidos durante y al finalizar el ejercicio se debieron básicamente al incremento en el porcentaje de células con bajo nivel de daño. A eso debe sumarse un incremento en el porcentaje de células con alto nivel de daño al finalizar el test de ejercicio.

3.1.2. Consumo de oxígeno y concentración de lactato en sangre durante el test de ejercicio

Los valores de consumo de oxígeno (VO_2) determinados por ergoespirometría y expresados en l/minuto se presentan en la tabla 3.5. Como puede observarse en dicha tabla, los animales iniciaron la prueba con un consumo medio de 4,22 l/min., alcanzando en el momento de máxima velocidad un consumo medio de 61,44 l/min., representando

La velocidad media máxima fue 12,5 ($\pm 0,5$) m/s y los animales alcanzaron un consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}) medio de 66,37 l/minuto ($\pm 15,37$), siendo los valores medios de cada equino los presentados en la tabla 3.1.6. Los incrementos en el consumo de oxígeno, con respecto al consumo basal, fueron diferentes ($p < 0,01$) en todos los tiempos evaluados, incluido el tiempo final, a prácticamente la misma velocidad (1,6 m/s) ($p < 0,0001$). En general, todos los tiempos evaluados presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), con la

excepción de los últimos 2 tiempos entre sí (4 y 1,5 m/s) ($p= 0,31$) y entre 10,5 y 12,5 m/s ($p= 0,096$).

La determinación de la concentración de lactato en sangre se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. Las muestras se obtuvieron al inicio del ejercicio (T0), al momento de alcanzar la máxima velocidad (12,5 m/s en promedio) (T1) y al finalizar el ejercicio (T2). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.7. En la figura 3.4 puede observarse el comportamiento combinado de ambas variables durante el test de ejercicio. En ella puede observarse como a los 12,5 m/s el consumo de oxígeno y las concentraciones de lactato en sangre alcanzan sus valores máximos, reflejando el esfuerzo metabólico energético.

Tabla 3.5. Valor medio de consumo de oxígeno (VO_2) en equinos Árabes y sus cruza durante el test de ejercicio.

Velocidad (m/s)	VO_2 (l/minuto)	$\pm DS$
1,6	4,221	1,516
4	17,388	2,672
6,5	27,251	4,413
8,5	41,247	7,476
10,5	52,424	10,948
12,5	61,444	13,411
4	33,281	7,523
1,5	18,563	5,494

Tabla 3.6. Consumo máximo de O₂ (VO_{2max}) en equinos Árabes y sus cruizas durante el test de ejercicio (media ± DS).

Equino N°	VO_{2max} (l/minuto)	±DS
1	60,56	11,06
2	82,72	14,90
3	54,77	12,17
4	67,60	10,15
5	41,11	3,57
6	82,64	12,87
7	75,24	11,36

Tabla 3.7. Concentración de lactato en sangre en equinos Árabes y sus cruizas durante el test de ejercicio.

Tiempo de muestreo	Lactato (mmol/l)
T0	1,34 (± 0,23) ^a
T1	14,74 (± 3,34) ^b
T2	14,02 (± 3,34) ^b

*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p< 0,05)

Figura 3.4. Comportamiento de las variables “consumo de oxígeno” y concentración de lactato en sangre durante el test de ejercicio.

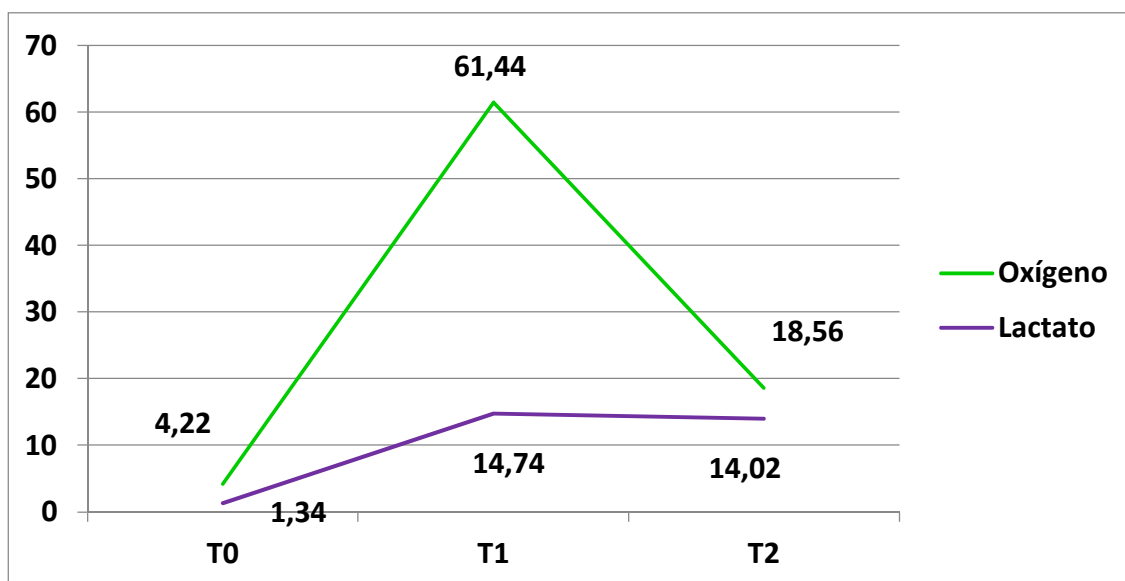
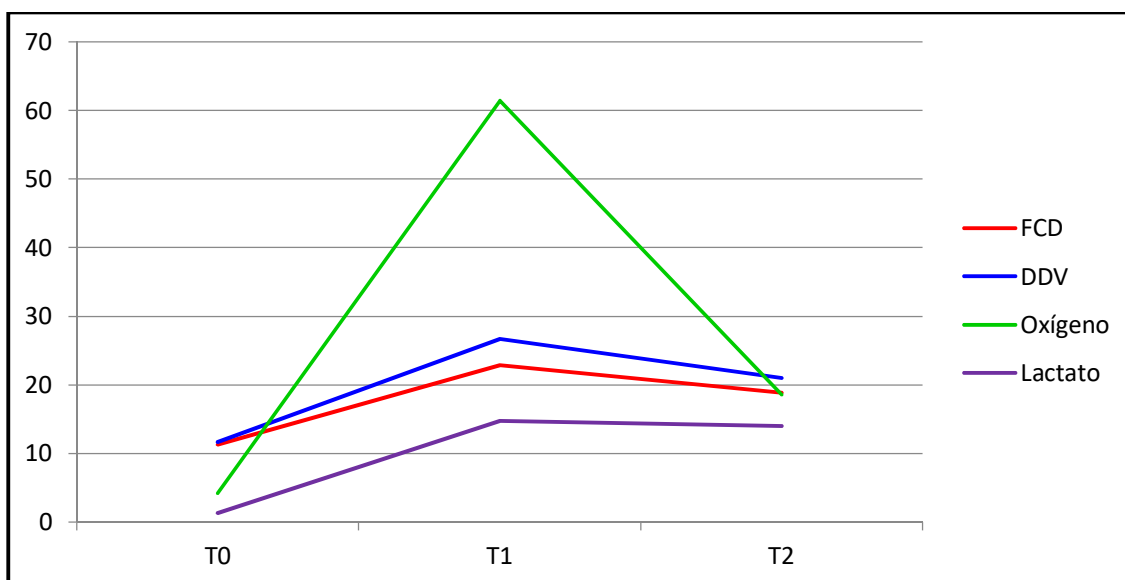


Figura 3.5. Relación existente entre consumo de oxígeno, concentración de lactato en sangre, DDV y FCD.



Como puede observarse en la figura 3.5., la mayor intensidad de daño en el ADN y la mayor frecuencia de células con daño en el ADN coinciden con los mayores niveles de lactato en sangre y con los mayores valores de consumo de

oxígeno. La correlación entre las mencionadas variables y los consumos de oxígeno y concentración de lactato fueron de: Oxígeno-DDV, 0,75 ($R^2= 0,55$); Oxígeno-FCD, 0,91 ($R^2= 0,83$); Lactato-DDV, 0,99 ($R^2= 0,99$); Lactato-FCD, 0,94 ($R^2= 0,89$) y Oxígeno-lactato, 0,72 ($R^2= 0,52$). Estos resultados sugieren una clara asociación entre la producción de daño en el ADN y las variables analizadas.

3.1.3 Composición de ácidos grasos de membrana y la respuesta a la capacidad oxidativa valorada por quimioluminiscencia como indicadores de estatus oxidativo sistémico durante el ejercicio.

La determinación de la composición de ácidos grasos de membrana, la relación de ácidos grasos saturados e insaturados, el índice de insaturación y la respuesta a la capacidad oxidativa valorada por quimioluminiscencia se realizaron a partir de los eritrocitos de los equinos sometidos a ejercicio en los tiempos descritos en la sección materiales y métodos. La tabla 3.8. describe las modificaciones experimentadas en la composición de ácidos grasos durante el ejercicio. En la tabla 3.9. pueden observarse los resultados al agrupar los ácidos grasos de membrana en saturados, mono-insaturados y poli- insaturados. Durante todo el test de ejercicio se produjo un aumento significativo del nivel de ácidos grasos saturados, alcanzando diferencias significativas al finalizar el test de ejercicio ($p < 0,05$). En apariencia, el incremento de ácidos grasos saturados se produjo a expensas de los ácidos grasos poli-insaturados, los cuales experimentaron una reducción la cual fue finalmente significativa al finalizar el ejercicio ($p < 0,05$). El nivel de ácidos grasos mono-insaturados no presentó modificaciones a lo largo del test de ejercicio. La relación entre ácidos grasos

saturados e insaturados experimento una marcada modificación durante el ejercicio, invirtiendo la relación, la cual inicialmente era favorable a los ácidos grasos insaturados, mientras que durante y al final del ejercicio termino siendo claramente favorable a los ácidos grasos saturados, alcanzando en esta última instancia diferencias significativas ($p < 0,05$) (Tabla 3.10.). El índice de insaturación confirmó la observación previa, reduciéndose desde un valor inicial de 97,33 hasta un valor final de 55,8 al final del ejercicio, momento en el cual las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$) (Tabla 3.10.).

El carácter oxidativo de las modificaciones expuestas previamente se confirmó a partir de la determinación de quimioluminiscencia, en la cual los valores observados fueron 96.053 cpm (± 17613), 67.477 (± 12331) y 60.619 ($\pm 2876,2$) para T0, T1 y T2 respectivamente (Figura 3.1.6). Los valores obtenidos fueron diferentes entre T0 y T1 y entre T0 y T2 ($p = 0,0413$ y $0,0131$ respectivamente). No se observaron diferencias entre T1 y T2.

Tabla 3.8. Composición de ácidos grasos de membrana de glóbulos rojos antes, durante el punto máximo de ejercicio y después del ejercicio.

Ácidos Grasos	Reposo (T0)	Ejercicio máximo (T1)	Pos ejercicio (T2)
C16:0	29.37 (± 0.54)	39.89 (± 0.85)	24.21 (± 0.58)
C18:0	13.08 (± 1.25)	17.84 (± 2.32)	25.46 (± 1.4)
C18:1	23.48 (± 1.8)	21.65 (± 3.05)	31.78 (± 1.8)

C18:2	28.65 (±2.11)	11.37 (±2.05)	31.68 (±2.04)
C18:3	0.87 (±0.23)	1 (±0.24)	0.95 (±0.25)
C20:4	0.71 (±0.56)	0.91 (±0.69)	0.87 (±0.68)

Tabla 3.9. Porcentaje de ácidos grasos saturados, mono-insaturados y poli-insaturados durante el test de ejercicio.

	T0	T1	T2
Saturados	38.12 ^a (±2.51)	41.95 ^a (±6.23)	57.79 ^b (±8.37)
Mono-insaturados	28.33 ^a (±2.05)	27.95 ^a (±2.68)	27.32 ^a (±3.94)
Poli-insaturados	33.28 ^a (±3.24)	30.11 ^a (±3.02)	12.98 ^b (±2.13)

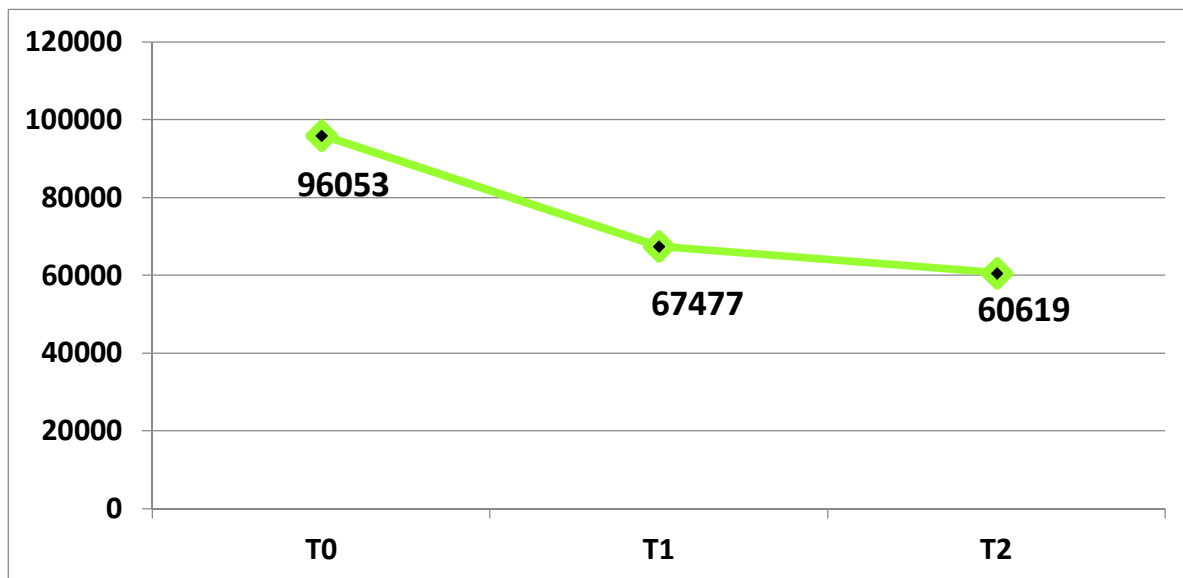
*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3.10. Relación ácidos grasos saturados/insaturados e índice de insaturación (UI) antes, durante el punto máximo de ejercicio y después del ejercicio.

	T0	T1	T2
Relación S/NS	0.28 ^a (±0.14)	1.2 ^b (±0.94)	1.43 ^b (±0.98)
Índice de In-Saturación	97.36 ^a (± 4.62)	90.34 ^a (± 9.25)	55.8 ^b (± 4.96)

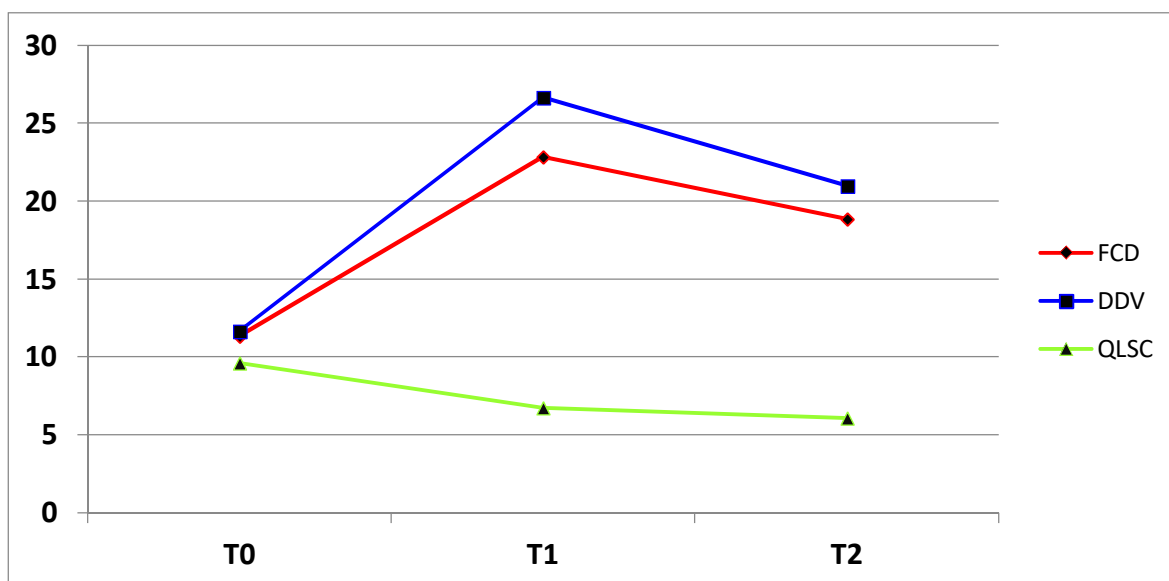
*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 3.6. Variación de la respuesta a la quimioluminiscencia en membranas de glóbulos rojos durante el test de ejercicio, expresado en cuentas por minuto (cpm).



Estos resultados sugieren claramente el ambiente pro-oxidante reinante en la sangre de los equinos durante la realización de las pruebas de ejercicio. A diferencia del daño en el ADN, la significación estadística de la mayor parte de las variables evaluadas se alcanzó al finalizar la prueba (especialmente la relación de ácidos grasos saturados/insaturados y el índice de insaturación), lo cual concuerda con el modelo trifásico de propagación de los radicales libres en general (RL) y de los radicales del oxígeno (ROS) en particular. Sin embargo, el análisis de quimioluminiscencia coincidió tanto con el comportamiento de DDV (coef. Corr: 0,96; $R^2= 0,92$) y FCD (coef. Corr: 0,83; $R^2= 0,63$), lo que sugiere especialmente el carácter oxidativo en la génesis de dichos daños (Figura 3.7.).

Figura 3.7. Relación existente entre los resultados obtenidos por quimioluminiscencia (valor corregido para la gráfica), DDV y FCD.



3.1.4. Determinación de la concentración de leucocitos y eritrocitos durante el test de ejercicio.

Las figuras 3.8. y 3.9. muestran el comportamiento de los elementos formes de la sangre durante el test de ejercicio. Los equinos comenzaron el test de ejercicio con una concentración media de leucocitos de 9267 células/ μl (± 603), aumentando a 10567 células/ μl (± 777) al momento de máxima intensidad de ejercicio, llegando a su máximo nivel al finalizar la prueba, con un valor medio de 11133 células/ μl ($\pm 1703,91$) (Figura 3.8.). Los valores basales solo fueron diferentes de los observados en T1 ($p= 0,041$), mientras que en T2 se observó una marcada tendencia ($p= 0,074$). No se observaron diferencias entre T1 y T2. Este incremento significativo en la concentración de leucocitos adquiere relevancia pues parte de estas células puede contribuir al ambiente pro-oxidante reinante en la sangre durante el ejercicio, siendo probablemente responsables

parciales del mantenimiento del daño una vez finalizado el ejercicio. El valor hematocrito (Figura 3.9.) aumento en la fase inicial del test de ejercicio, presentando valores iniciales de 35 (± 2) en T0, aumentando a 54 (± 3) en T1 y reduciéndose finalmente a 48 ($\pm 2,64$) en T2. Solo se observaron diferencias entre T0 y T1 ($p= 0,042$).

Figura 3.8. Concentración de leucocitos durante el test de ejercicio (células/ μ l).

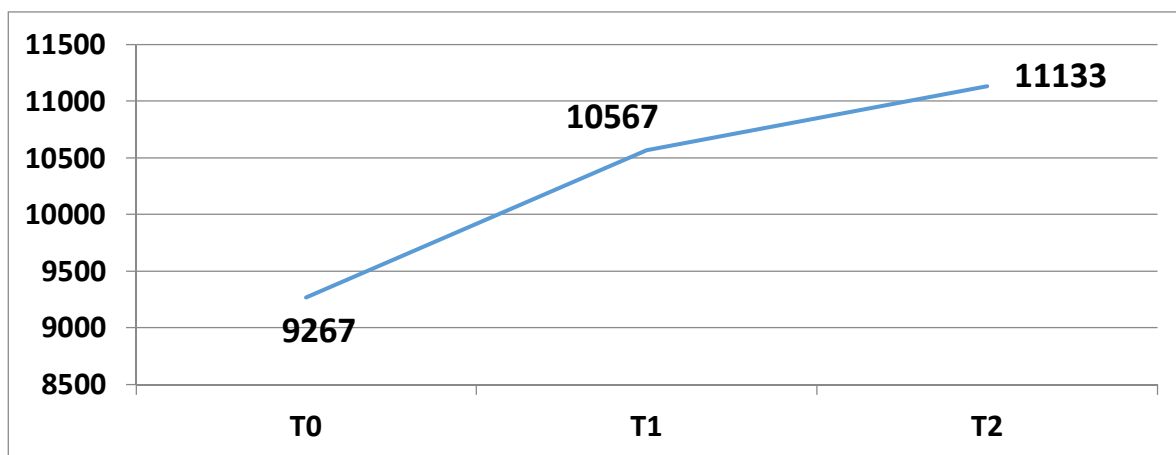
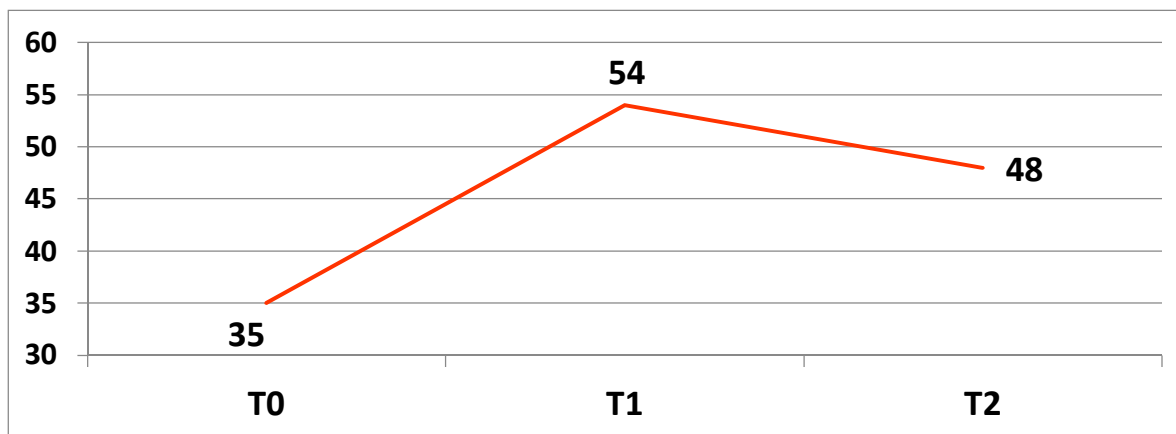


Figura 3.9. Valor hematocrito durante el test de ejercicio (%).



3.1.5. Determinación de Urea y CPK como indicadores de daño muscular.

En cada uno de los ensayos de esfuerzo se tomaron muestras de sangre que fueron utilizadas para determinar la actividad de urea y creatininfosfoquinasa (CPK), a fin de identificar daño muscular e indirectamente respuesta inflamatoria producto del ejercicio. En la tabla 3.11. se observan los resultados de la determinación de urea basal, a las 12 y 24 hs pos ejercicio. Los valores medios basales de urea fueron de 0,345 g% ($\pm 0,073$), aumentado a 0,355 g% ($\pm 0,069$) a las 12 hs pos ejercicio y a 0,369 g% ($\pm 0,069$) a las 24 hs pos ejercicio (figura 3.1.10.). En todos los casos los valores de urea fueron normales (valor de referencia: 0,1-0,4 g%) y pese a que se observó un incremento en los valores de urea, en ningún caso dichos incrementos fueron significativos.

Los valores obtenidos con la CPK se presentan en la tabla 3.13. El comportamiento de la CPK fue diferente al observado con la urea (figura 3.11.), presentando un pico estadísticamente significativo a las 12 hs pos ejercicio (Tabla 3.14.). Tanto a las 12 como a las 24 hs pos ejercicio, los valores obtenidos fueron superiores al rango considerado normal (48-366 mUI/ml). Los valores basales medios fueron de 341,79 mUI/ml ($\pm 216,85$), a las 12 hs pos ejercicio fueron de 618,07 ($\pm 644,23$) y a las 24 hs pos ejercicio fueron de 373,11 ($\pm 336,3$) (Tabla 3.12.).

Tabla 3.11. Resultados medios de la determinación de urea (g%) obtenidos en los 6 equinos utilizados durante los 4 test realizados. (Valor de referencia 0,1-0,4 g%)

	Basal	Post 12	Post 24
1° Test	0,367 (± 0,082)	0,367 (± 0,052)	0,333 (± 0,082)
2° Test	0,317 (± 0,041)	0,367 (± 0,052)	0,383 (± 0,041)
3° Test	0,380 (± 0,084)	0,380 (± 0,084)	0,400 (± 0,100)
4° Test	0,320 (± 0,081)	0,304 (± 0,081)	0,364 (± 0,033)

Tabla 3.12. Valores de p obtenidos al comparar los valores de urea previo al ejercicio, a las 12 y a las 24 hs. pos ejercicio.

	Valor de p
Basal-Pos 12	0,43458177
Basal-Pos 24	0,12960642
Post 12-Pos 24	0,27543814

Figura 3.10. Valores de urea en sangre (expresada en g%) obtenidos en equinos sometidos a un test de esfuerzo en los tiempos 0, pos 12 hs y pos 24 hs.

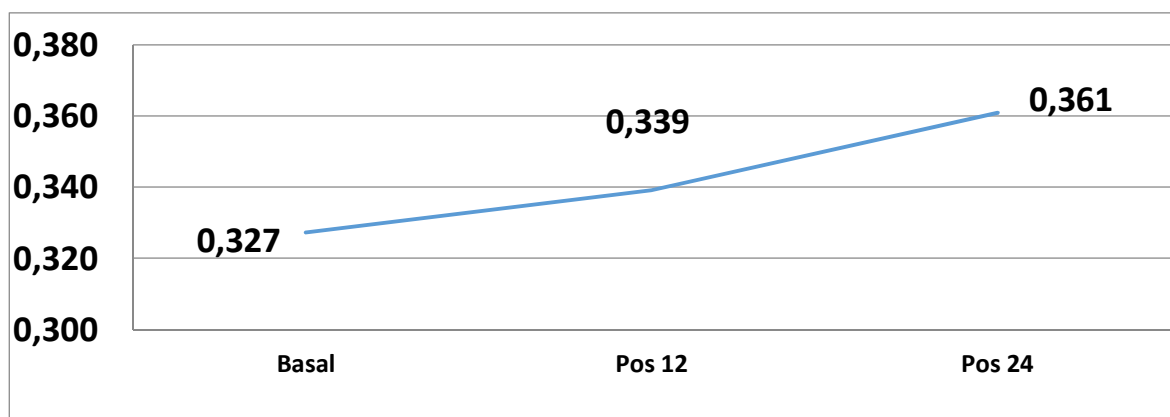


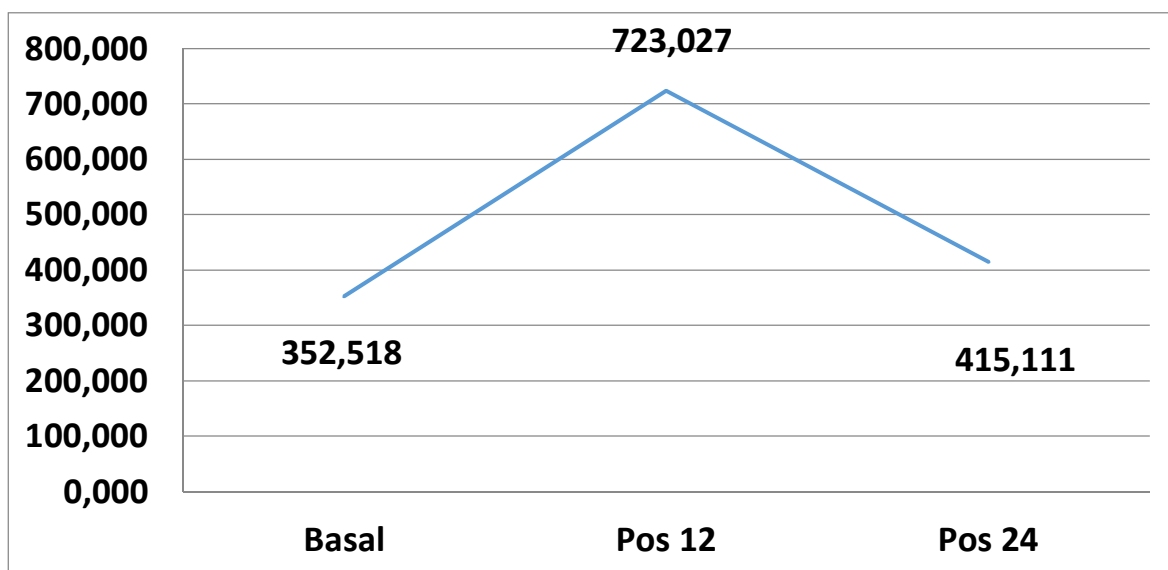
Tabla 3.13. Resultados medios de la determinación de CPK (mUI/ml) obtenidos en los 7 equinos utilizados durante los 4 test realizados. (Valor de referencia 48-366 mUI/ml)

	Basal	Post 12	Post 24
1° Test	270,46 (± 89,47)	240,9 (± 69,24)	221,17 (± 55,81)
2° Test	303 (± 104,57)	1089,83 (± 1057,36)	597,33 (± 584,50)
3° Test	400,72 (± 313,17)	561,32 (± 331,78)	329,74 (± 155,06)
4° Test	279,35 (± 208,05)	234,6 (± 93,29)	194,58 (± 49,80)

Tabla 3.14. Valores de p obtenidos al comparar los valores de CPK previo al ejercicio, a las 12 y a las 24 hs post ejercicio.

	Valor de p
Basal-Pos 12	0,04716542
Basal-Pos 24	0,6229585
Post 12-Pos 24	0,00302307

Figura 3.11. Valores de CPK en sangre (expresada en mUI/ml) obtenidos en equinos sometidos a un test de esfuerzo en los tiempos 0, pos 12 hs y pos 24 hs.



Si se tiene en cuenta que las variaciones observadas especialmente en la CPK fueron significativas y que dicha enzima puede considerarse un indicador de daño muscular, es posible especular entonces que la asociación entre daño en el ADN y la liberación de mediadores y agentes de la inflamación durante el fenómeno del ejercicio es de baja o nula significación, al menos durante esta fase, y siendo posiblemente agentes activos en la generación de daño post-ejercicio.

3.2. EXPERIMENTO 2: Determinación de la cinética del daño en el ADN durante el ejercicio y su relación con el consumo de oxígeno y la concentración de lactato en sangre en equinos SPC.

3.2.1. Determinación de daño en el ADN como indicador de daño sistémico durante el ejercicio en caballos SPC.

Al igual que en el experimento 1, la determinación de daño en el ADN se realizó sobre leucocitos de sangre periférica, utilizando el ensayo cometa (versión alcalina). Las muestras se obtuvieron al subir los caballos a la cinta ergométrica (T0: Basal), durante el ejercicio al alcanzar los 8,5 mt/s (T1), a los 15 m/s (T2), al finalizar el ejercicio (T3) y a los 30 minutos pos ejercicio (T4), según el protocolo descrito en materiales y métodos. Se realizaron 4 repeticiones. Las tablas 3.15, 3.16, 3.17, 3.18 y 3.19 muestran los resultados obtenidos por cada caballo (valores medios \pm desvío estándar), mientras que la tabla 20 muestra el resultado global del ejercicio sobre el parámetro daño en el ADN en los 7 equinos sometidos a este test de ejercicio.

Tabla 3.15. Resultados obtenidos con el ensayo cometa durante T0 (N= 7; 4 repeticiones). Valores medios (\pm DS)

Equino	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	DDV* (UA)	FCD*¹ (%)
1	74 ($\pm 5,08$)	22,5 ($\pm 2,02$)	1,5 ($\pm 0,012$)	1,5 ($\pm 0,011$)	0,5 ($\pm 0,045$)	32 ($\pm 2,9$)	26 ($\pm 2,4$)
2	51	34	11	1	3	71	49

	(±4,98)	(±3,04)	(±1,03)	(±0,08)	(±2,76)	(±6,83)	(±3,9)
3	64 (± 5,57)	36 (±3,06)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	36 (± 3,03)	36 (±3,21)
4	59 (± 5,76)	20 (± 1,92)	16 (± 0,17)	2 (± 0,18)	3 (± 0,29)	70 (± 0,68)	41 (±0,39)
5	51 (± 4,87)	48 (±4,65)	1 (± 0,08)	1 (± 0,08)	0 (±0,0)	53 (± 5,21)	49 (± 4,85)
6	73 (± 7,21)	23 (± 2,01)	1 (± 0,07)	3 (± 0,28)	0 (± 0,0)	34 (± 3,17)	27 (± 2,54)
7	75 (± 7,49)	22 (± 2,23)	2 (± 0,19)	0 (± 0,0)	1 (± 0,09)	30 (±2,93)	25 (± 2,43)

*Índice de daño en el ADN; *¹Frecuencia de células con daño en el ADN

Tabla 3.16. Resultados obtenidos con el ensayo cometa durante T1 (N= 7; 4 repeticiones). Valores medios (± DS)

Equino	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	DDV* (UA)	FCD*¹ (%)
1	75,5 (± 7,48)	21,5 (± 2,03)	1,5 (± 1,48)	2,5 (± 2,4)	0,5 (± 0,04)	34 (± 3,2)	24,5 (± 2,08)
2	78 (± 6,49)	17 (±1,53)	2 (± 0,21)	2 (± 0,18)	1 (± 0,09)	31 (± 3,09)	22 (± 2,23)
3	73 (± 7,28)	26 (± 2,67)	1 (± 0,09)	0 (± 0,0)	0 (± 0,0)	28 (± 2,65)	27 (± 2,67)
4	42 (± 4,01)	37 (± 3,79)	6 (± 0,53)	11 (± 1,09)	4 (± 3,89)	98 (± 8,98)	58 (± 5,65)

5	42 (± 4,21)	49 (± 4,84)	5 (± 4,89)	3 (± 0,31)	1 (± 0,08)	72 (± 7,11)	58 (± 5,43)
6	54 (± 5,38)	37 (± 3,65)	9 (± 0,89)	0 (± 0,0)	0 (± 0,0)	55 (± 5,36)	46 (± 4,35)
7	34 (± 3,24)	59 (± 5,87)	4 (± 0,37)	2 (± 0,19)	1 (± 0,09)	77 (± 7,43)	66 (± 6,55)

*Índice de daño en el ADN; *¹Frecuencia de células con daño en el ADN

Tabla 3.17. Resultados obtenidos con el ensayo cometa durante T2 (N= 7; 4 repeticiones). Valores medios (± DS)

Equino	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	DDV* (UA)	FCD*¹ (%)
1	44 (± 4,21)	54,5 (± 5,25)	1 (± 0,09)	0 (± 0,0)	0,5 (± 0,04)	58,5 (± 5,37)	56 (± 5,23)
2	30 (± 2,98)	65 (± 6,34)	4 (± 0,38)	1 (± 0,08)	0 (± 0,0)	76 (± 0,71)	70 (± 6,89)
3	44 (± 4,34)	45 (± 4,28)	5 (± 0,45)	1 (± 0,08)	5 (± 0,39)	78 (± 0,69)	56 (± 5,45)
4	17 (± 1,67)	64 (± 6,36)	12 (± 1,18)	2 (± 0,19)	5 (± 0,38)	114 (± 11,21)	83 (± 8,21)
5	32 (± 3,01)	57 (± 5,37)	5 (± 0,47)	1 (± 0,09)	5 (± 0,37)	90 (± 9,11)	68 (± 6,77)
6	44 (± 4,22)	46 (± 4,16)	4 (± 0,39)	2 (± 0,18)	4 (± 0,37)	76 (± 7,45)	56 (± 5,45)
7	37 (± 3,45)	60 (± 5,81)	2 (± 0,19)	0 (± 0,0)	0 (± 0,0)	64 (± 6,23)	63 (± 6,18)

*Índice de daño en el ADN; *¹Frecuencia de células con daño en el ADN

Tabla 3.18. Resultados obtenidos con el ensayo cometa durante T3 (N= 7; 4 repeticiones). Valores medios (\pm DS)

	Grado	Grado	Grado	Grado	Grado	DDV*	FCD*¹
	1	2	3	4	5	(UA)	(%)
Equino	62,5	31,5	1	1	4	52,5	37,5
1	(\pm 6,31)	(\pm 3,18)	(\pm 0,09)	(\pm 0,08)	(\pm 0,38)	(\pm 5,01)	(\pm 3,27)
Equino	31	24	27	17	1	133	69
2	(\pm 3,12)	(\pm 2,23)	(\pm 2,55)	(\pm 1,68)	(\pm 0,08)	(\pm 12,41)	(\pm 7,01)
Equino	32	57	5	1	5	90	68
3	(\pm 3,18)	(\pm 5,68)	(\pm 0,48)	(\pm 0,09)	(\pm 0,47)	(\pm 8,78)	(\pm 6,78)
Equino	44	46	4	2	4	76	56
4	(\pm 4,02)	(\pm 4,78)	(\pm 0,38)	(\pm 0,18)	(\pm 0,37)	(\pm 7,61)	(\pm 5,45)
Equino	64	29	1	1	5	54	36
5	(\pm 6,23)	(\pm 2,78)	(\pm 0,08)	(\pm 0,09)	(\pm 0,46)	(\pm 4,78)	(\pm 3,47)
Equino	61	34	1	1	3	51	39
6	(\pm 5,98)	(\pm 3,25)	(\pm 0,09)	(\pm 0,07)	(\pm 0,28)	(\pm 4,98)	(\pm 3,91)
Equino	44	43	8	4	1	75	56
7	(\pm 4,38)	(\pm 4,02)	(\pm 0,87)	(\pm 0,39)	(\pm 0,06)	(\pm 6,89)	(\pm 5,57)

*Índice de daño en el ADN; *¹Frecuencia de células con daño en el ADN

Tabla 3.19. Resultados obtenidos con el ensayo cometa durante T4 (N= 7; 4 repeticiones). Valores medios (\pm DS)

Equino	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	DDV*	FCD*¹
1	48,5 (\pm 4,78)	47,5 (\pm 4,67)	1,5 (\pm 0,15)	1 (\pm 0,08)	1,5 (\pm 0,14)	59,5 (\pm 5,99)	51,5 (\pm 5,21)
2	25 (\pm 2,45)	67 (\pm 6,32)	7 (\pm 0,67)	1 (\pm 0,08)	0 (\pm 0,0)	84 (\pm 7,89)	75 (\pm 7,49)
3	37 (\pm 3,55)	51 (\pm 4,99)	10 (\pm 0,92)	0 (\pm 0,0)	2 (\pm 0,19)	79 (\pm 7,77)	63 (\pm 6,23)
4	32 (\pm 3,18)	59 (\pm 5,87)	7 (\pm 0,68)	1 (\pm 0,09)	1 (\pm 0,08)	80 (\pm 7,86)	68 (\pm 6,78)
5	32 (\pm 3,23)	65 (\pm 6,51)	2 (\pm 0,19)	0 (\pm 0,0)	1 (\pm 0,09)	73 (\pm 6,99)	68 (\pm 6,84)
6	51 (\pm 5,08)	46 (\pm 4,33)	1 (\pm 0,06)	2 (\pm 0,18)	0 (\pm 0,0)	54 (\pm 5,38)	49 (\pm 4,89)
7	46 (\pm 4,57)	49 (\pm 4,87)	2 (\pm 0,17)	0 (\pm 0,0)	3 (\pm 0,29)	65 (\pm 6,78)	54 (\pm 5,41)

*Índice de daño en el ADN; *¹Frecuencia de células con daño en el ADN

Tabla 3.20. Resultados generales obtenidos con el ensayo cometa durante T0, T1, T2, T3 y T4 (N= 7; 4 repeticiones).

	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5	DDV* (UA)	FCD*¹ (%)
T0	63,86 (\pm 10,53)	29,36 (\pm 10,35)	4,64 (\pm 6,25)	1,21 (\pm 1,07)	1,07 (\pm 1,37)	46,57 (\pm 18)	36,14 (\pm 10,53)

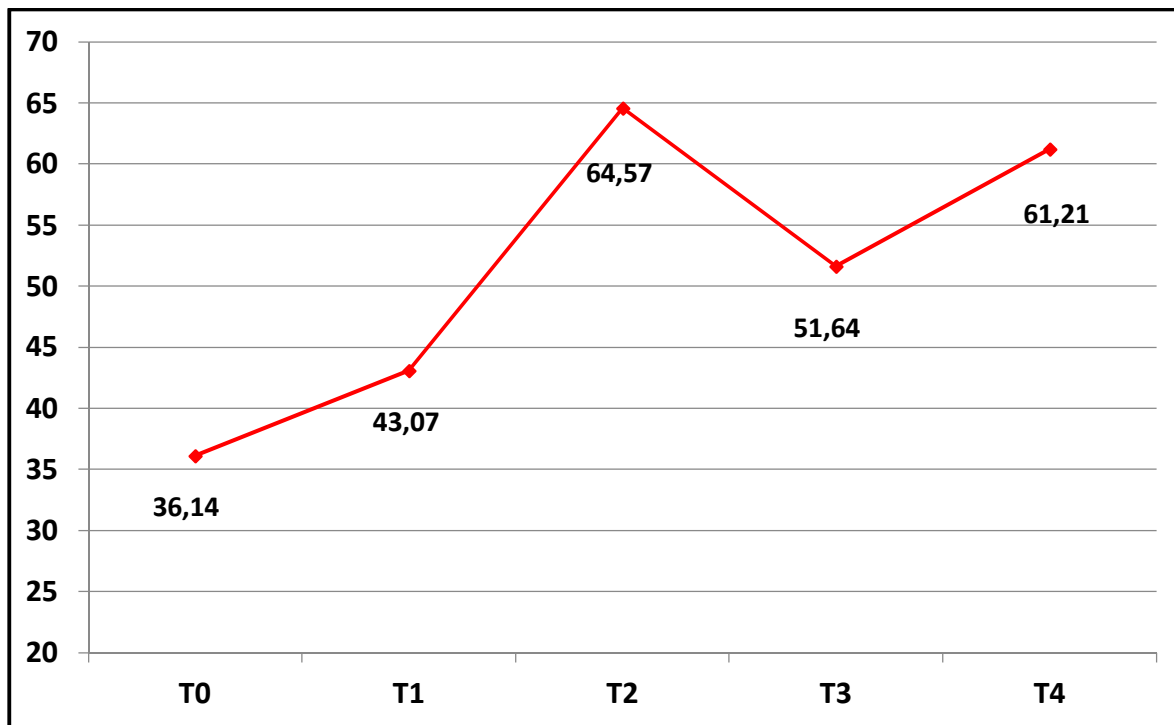
T1	56,93 (± 18,38)	35,21 (± 15,09)	4,07 (± 2,86)	2,93 (±3,75)	1,07 (± 1,37)	56,43 (±26,94)	43,07 (± 18,38)
T2	35,43 (± 10,03)	55,93 (± 8,01)	4,71 (± 3,55)	1,00 (± 0,82)	2,79 (± 2,48)	79,50 (±18,30)	64,57 (± 10,03)
T3	48,36 (± 14,21)	37,79 (± 11,44)	6,71 (± 9,32)	3,86 (± 5,90)	3,29 (± 1,70)	75,93 (±29,18)	51,64 (± 14,21)
T4	38,79 (± 9,84)	54,93 (± 8,65)	4,36 (± 3,57)	0,71 (± 0,76)	1,21 (± 1,07)	70,64 (±11,36)	61,21 (± 9,84)

*Índice de daño en el ADN expresado como unidades arbitrarias (UA);

*¹Porcentaje de células con daño en el ADN

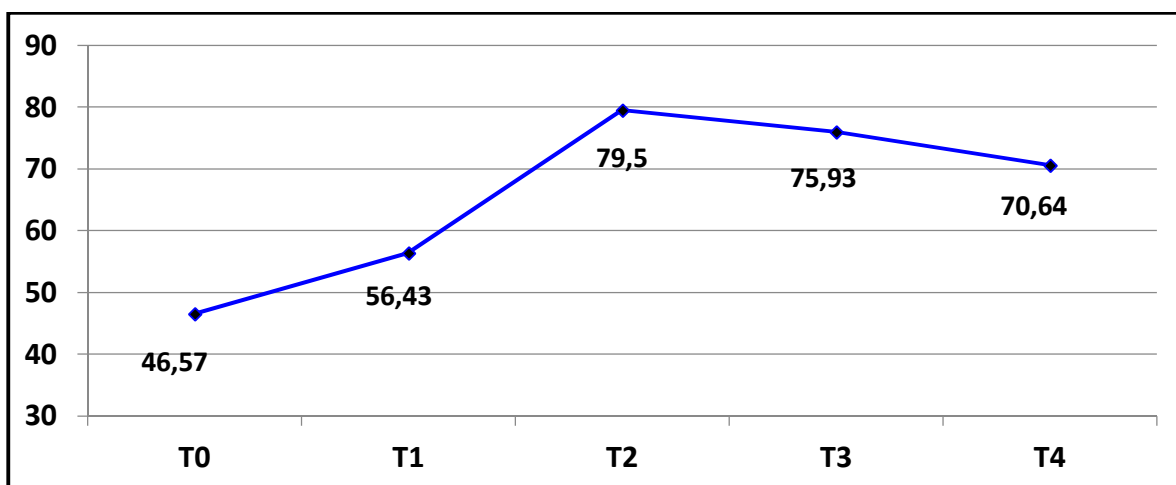
Se analizó la frecuencia de células con daño en el ADN, los grados de daño en el ADN y el índice de daño (DDV: del inglés DNA damage value). La frecuencia basal de células con daño en el ADN (T0) fue del 36,14%. Durante todo el ejercicio se produjo un incremento de dicha frecuencia, alcanzando valores de 43,07% a los 8,5 m/s (T1), 64,57% a los 15 m/s (T2), 52,64% al terminar el ejercicio (T3) y 61,21% 30 minutos post ejercicio (T4). Los mencionados incrementos fueron significativos entre T0 y T2, T0 y T3 y entre T0 y T4 ($p= 0,00011$; 0,019 y $p< 0,00001$ respectivamente) (Figura 3.12).

Figura 3.12. Frecuencia de células con daño en el ADN antes (T0), a los 8,5 m/s (T1), durante el ejercicio momento de máximo esfuerzo (T2), al término inmediato del ejercicio (T3) y 30 min. Post ejercicio (T4).



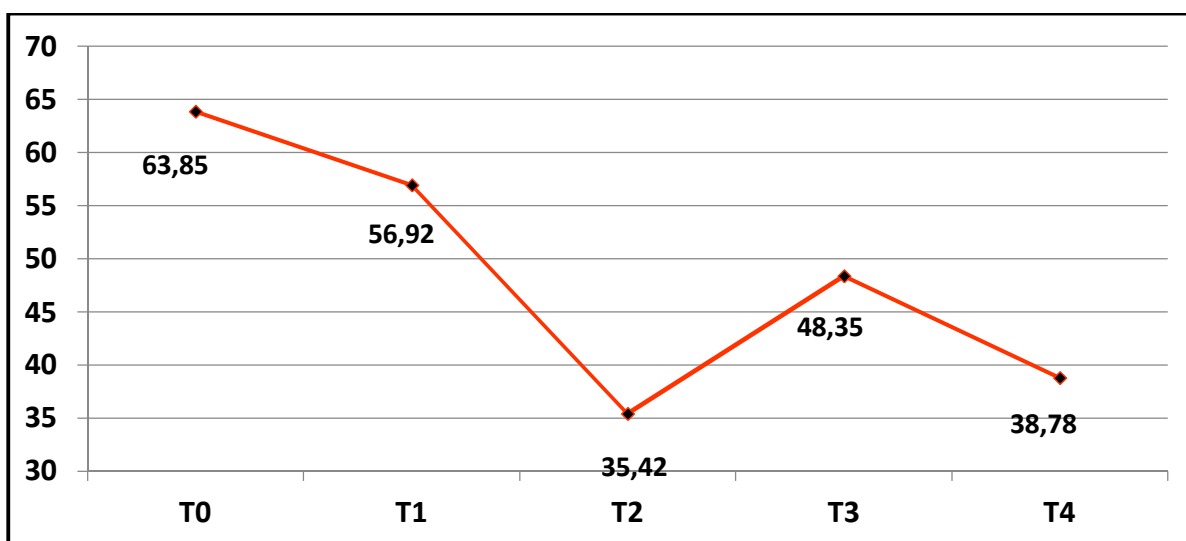
Al igual, que con la frecuencia de células con daño, el índice de daño en el ADN presentó valores mayores a los basales durante todo el test de ejercicio. El DDV basal (T0) fue del 46,57 UA. Los valores alcanzados durante el resto del test fueron 56,43 UA a los 8,5 m/s (T1), 79,5 UA a los 15 m/s (T2), 75,93 UA al terminar el ejercicio (T3) y 70,64 UA 30 minutos post ejercicio (T4). Los mencionados incrementos fueron significativos entre T0 y T2, T0 y T3 y entre T0 y T4 ($p= 0,002$; $0,021$ y $p< 0,0056$ respectivamente) (Figura 3.13).

Figura 3.13. Variaciones de la intensidad del daño en el ADN (DDV) durante el test de ejercicio (valores medios obtenidos de 7 caballos y 4 repeticiones).



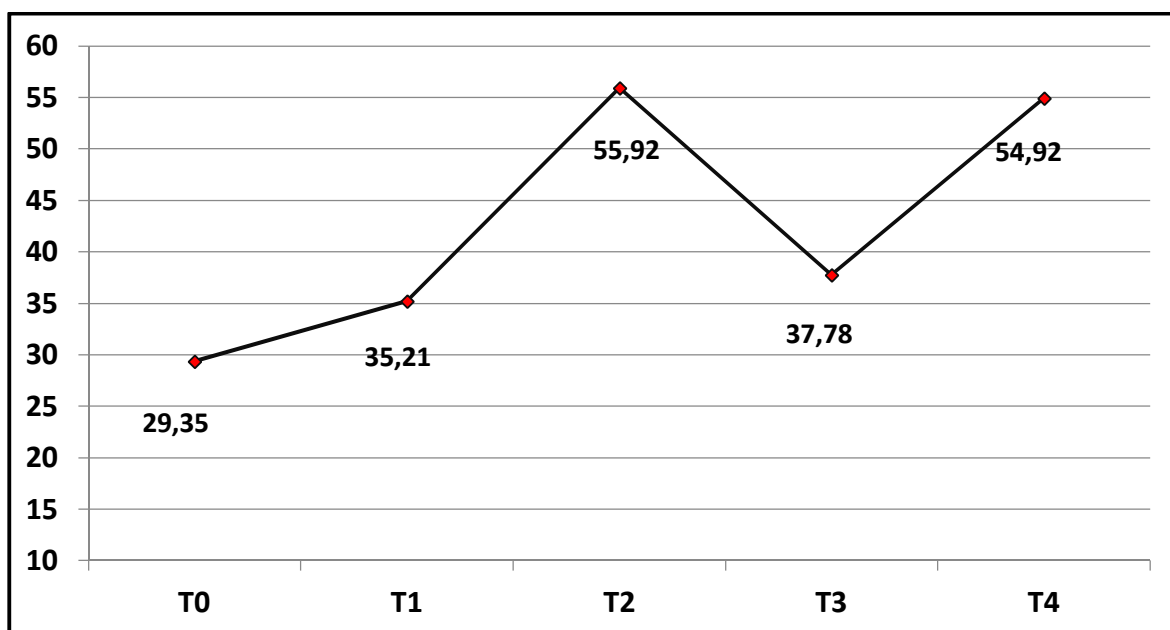
Los resultados obtenidos al realizar el análisis de los niveles de daño en el ADN por apreciación microscópica arrojaron una reducción del número de células sin daño en el ADN (grado 1) durante todo el test de ejercicio. Dicha reducción fue significativa especialmente entre T0 y T2, T0 y T3 y entre T0 y T4 ($p= 0,00011$; 0,019 y 0,0003 respectivamente) (Figura 3.14).

Figura 3.14. Cinética de la presencia de células grado 1 (%) a lo largo del test de ejercicio.



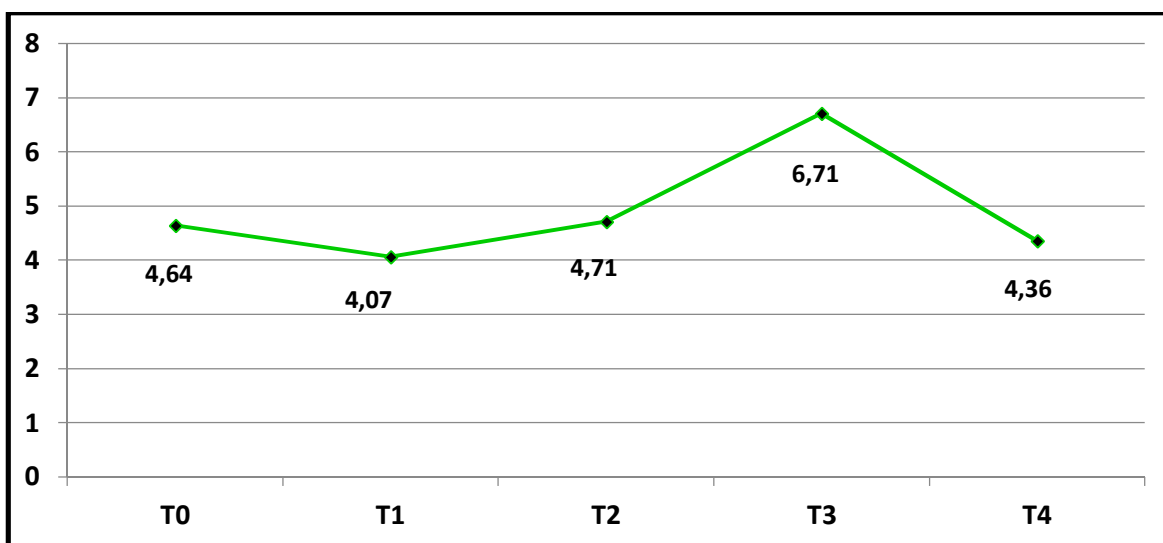
El porcentaje de células con mínimo nivel de daño en el ADN (grado 2) presento un comportamiento inverso al observado para grado 1, siendo todos los valores observados durante el test mayores a los basales (T0). Sin embargo, los incrementos solo fueron significativos entre T1 y T2 y entre T1 y T4 ($p= 0,009$ y $0,02$ respectivamente) (Figura 3.15).

Figura 3.15. Cinética de la presencia de células grado 2 (%) a lo largo del test de ejercicio.



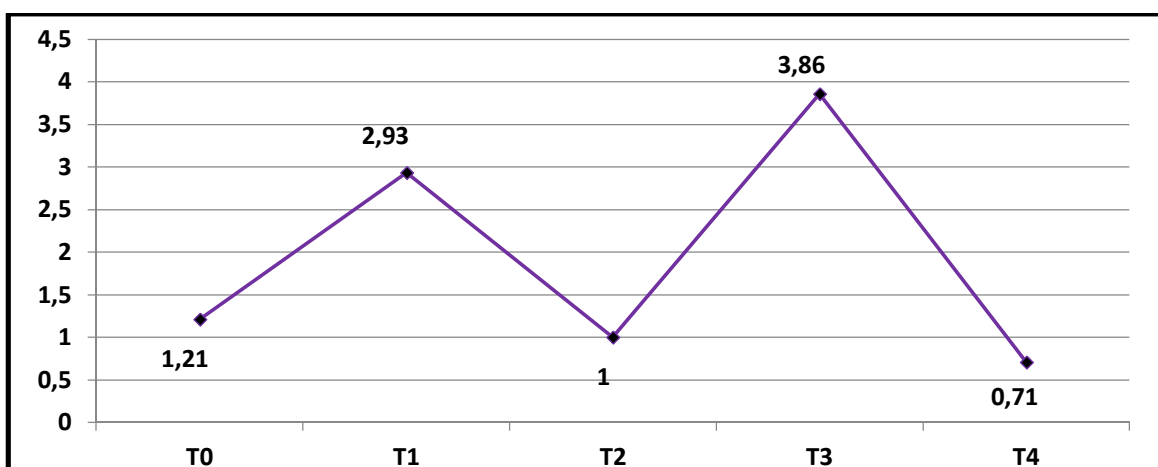
El porcentaje de células con nivel moderado de daño en el ADN (grado 3) presento un comportamiento similar en todos los tiempos estudiados, no observándose en ningún caso diferencias significativas. (Figura 3.16).

Figura 3.16. Cinética de la presencia de células grado 3 (%) a lo largo del test de ejercicio.



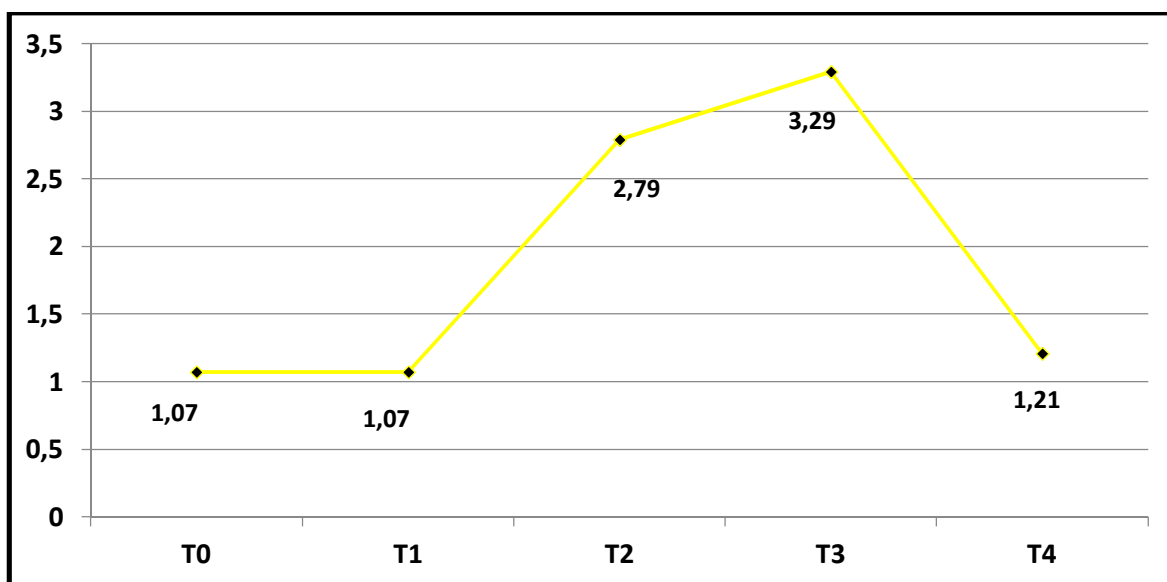
El comportamiento de las células con intenso nivel de daño (grado 4) puede observarse en la figura 3.17. El porcentaje de este tipo de células experimento un incremento visualmente marcado especialmente en T1 y en T3. Sin embargo, dichos aumentos no fueron significativos, observándose solo tendencias entre T1 y T4 y entre T3 y T4 ($p= 0,075$ y $0,093$ respectivamente).

Figura 3.17. Cinética de la presencia de células grado 4 (%) a lo largo del test de ejercicio.



El comportamiento de las células con máximo nivel de daño (grado 5) puede observarse en la figura 3.18. El porcentaje de este tipo de células se mantuvo estable hasta los 8,5 m/s (T1), aumentando marcadamente a los 15 m/s (T2), llegando a su máximo al finalizar el test (T3). Pese a ello, y al igual que con las células grado 4, no se observaron diferencias significativas, solo observándose tendencias entre T0 y T2 ($p= 0,067$), T1 y T2 ($p= 0,67$) y T2 y T4 ($p= 0,075$).

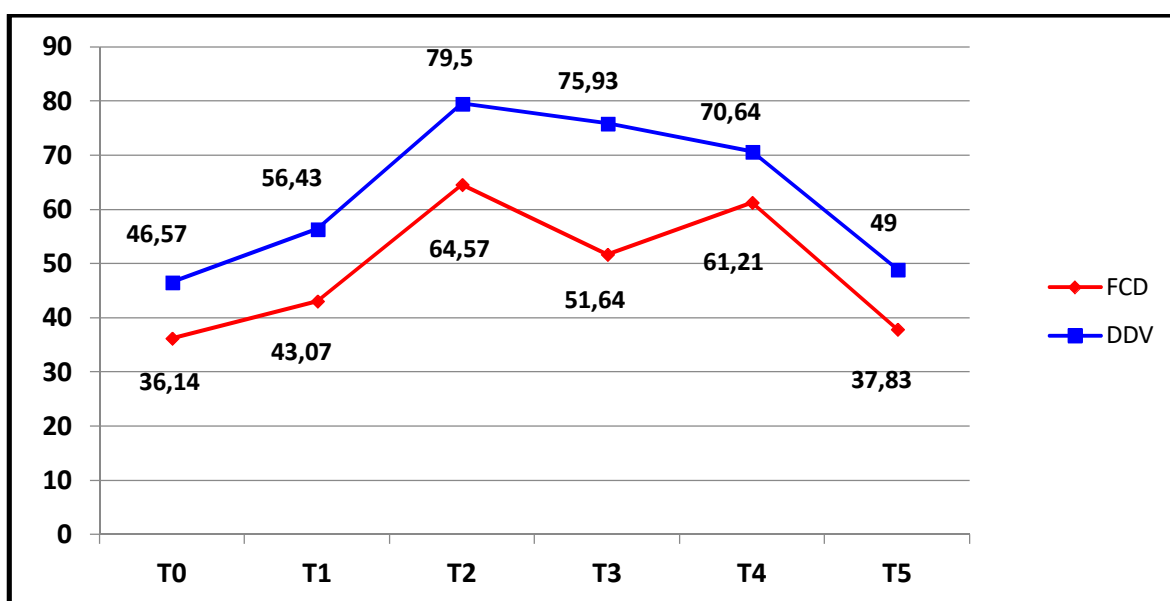
Figura 3.18. Cinética de la presencia de células grado 5 (%) a lo largo del test de ejercicio.



Al igual que en el experimento 1, dado que se utilizaron los mismos animales, se realizó la misma especulación, considerando que los valores iniciales de la segunda, tercera y cuarta repetición representan el valor final de la serie previa de ejercicio. Los valores obtenidos 30 días post ejercicio (en este caso T5) para células grado 1 fueron: 62,17 ($\pm 10,44$); para grado 2: 30,50 ($\pm 10,84$); para grado 3: 5,17 ($\pm 6,68$); para Grado 4: 1,17 ($\pm 1,17$) y para grado 5:

1,17 ($\pm 1,47$). Estos valores fueron similares a los obtenidos para T0 ($p > 0,05$) y no se diferenciaron del comportamiento observado para T0 en relación a los otros tiempos. Los valores de DDV y frecuencia de células con daño fueron: 49 ($\pm 18,42$) y 37,83 ($\pm 10,44$) respectivamente. La comparación de estos últimos resultados con los obtenidos en T0, T1, T2, T3 y T4 arrojo la ausencia de diferencias entre T0 y T5 y T1 y T5 ($p < 0,05$), mientras que se observaron diferencias entre T2 y T5 ($p = 0,004$ para DDV y 0,0003 para FCD), entre T3 y T5 ($p = 0,038$ para DDV y 0,037 para FCD) y entre T4 y T5 ($p = 0,012$ para DDV y 0,0008 para FCD), la presencia de diferencias significativas con respecto a T0 y T1 ($p < 0,01$). Según este criterio de análisis, el DDV y la frecuencia de células con daño siguieron el comportamiento presentado en la figura 3.19.

Figura 3.19. Comportamiento del DDV y la frecuencia de células con daño en el ADN (FCD) durante el experimento 2, asumiendo los valores iniciales de los SETs 2, 3 y 4 como tiempos T5.



Al igual que en el experimento 1, el daño en el ADN se produjo durante el ejercicio y especialmente durante el momento de máximo esfuerzo. Sin embargo, debido a la reformulación del modelo experimental, fue posible establecer la existencia de un comportamiento bifásico con un segundo pico de intensidad de daño establecido en este modelo a los 30 minutos pos ejercicio. Analizando los resultados en su conjunto, la frecuencia de células con daño mostró un crecimiento constante hasta alcanzar los equinos la velocidad de 15 m/s, momento en el cual la mencionada frecuencia aumento casi un 30%. Luego de ello, al término del ejercicio, se produjo una leve reducción en el número de células dañadas, para luego volver a aumentar a los 30 minutos de terminado el ejercicio. En contraposición, la intensidad del daño en el ADN alcanzó su máximo valor en coincidencia con el máximo esfuerzo. A partir de este momento, la intensidad del daño se redujo sustancialmente, incluso siendo menor la intensidad a los 30 minutos que al finalizar el ejercicio. El hecho de que ambas variables (DDV y FCD) no presenten comportamientos similares puede explicarse a partir de la observación del comportamiento de las células con sus diferentes niveles de daño. Así, al igual que en el experimento 1, el grueso de las células afectadas presentaron mínimo nivel de daño en el ADN (células grado 2), siendo el componente principal de la frecuencia de células con daño, lo cual explica la similitud encontrada entre las curvas de ambas variables (figura 3.20.). Por el contrario, la intensidad del daño en el ADN se corresponde con la aparición de células con mayor nivel de daño las cuales aumentan su número a medida que progresa el test de ejercicio. Como puede observarse en la figura 3.21, la intensidad del daño a 15 m/s está dada básicamente por la acumulación de gran cantidad de células con mínimo nivel de daño. Al finalizar el ejercicio la intensidad

de DDV es apenas menor pero el patrón de células de daño varía sustancialmente, reduciéndose la participación de las células grado 2 y aumentando la participación de aquellas con moderado o intenso daño en el ADN (grados 3, 4 y 5). Finalmente, 30 minutos pos ejercicio, es nuevamente la participación de células con bajo nivel de daño quienes determinan la intensidad de DDV.

Figura 3.20. Comportamiento de las variables FCD y células grado 2 a lo largo del ensayo.

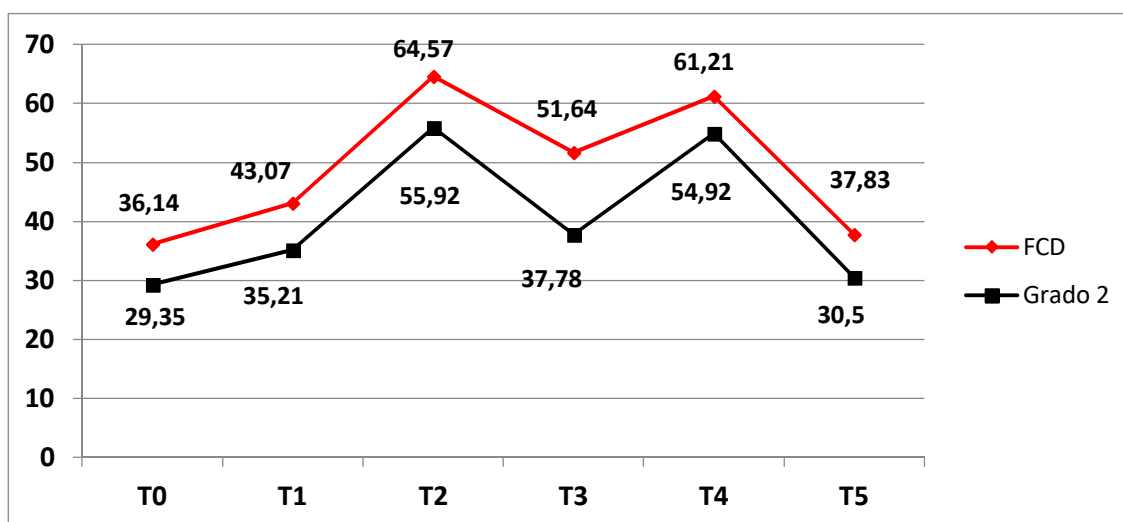
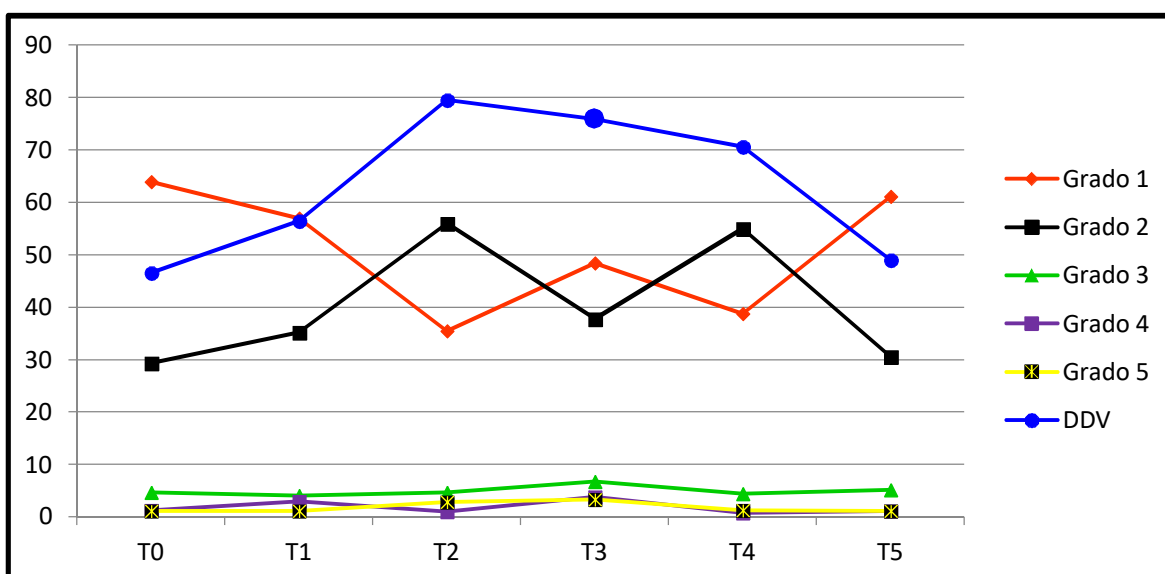


Figura 3.21. Comportamiento de las variables DDV y de las células con diferentes grados de daño en el ADN a lo largo del ensayo.



3.2.2. Consumo de oxígeno y concentración de lactato en sangre durante el test de ejercicio

Los valores de consumo de oxígeno determinados por ergoespirometría y expresados en l/minuto se presentan en la tabla 3.21. Como puede observarse en dicha tabla, los animales iniciaron la prueba (1,7 m/s) con un consumo medio de 6,18 l/min., alcanzando a los 15 m/s un consumo medio de 83,93 l/min., representando un incremento de 13,6 veces el consumo mínimo. Los incrementos en el consumo de oxígeno, con respecto al consumo basal, fueron diferentes ($p < 0,001$) en todos los tiempos evaluados, incluido el tiempo final, a la misma velocidad de 1,7 m/s ($p = 0,00043$). En general, todos los tiempos evaluados presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), con la excepción de los últimos 2 tiempos entre sí (4 y 1,7 m/s) ($p = 0,08$), entre 6,5 y 8,5 m/s ($p = 0,057$), 6,5 y 1,7 m/s finales ($p = 0,132$), 8,5 y 10,5 m/s ($p = 0,089$), 8,5 y 4 m/s finales ($p = 0,345$), 10,5 y 12,5 m/s ($p = 0,086$) y 12,5 y 15 m/s ($p = 0,065$).

Para la determinación de la concentración de lactato en sangre las muestras se obtuvieron al inicio del ejercicio (T0), a los 8,5 m/s (T1), a los 15 m/s (T2), al finalizar el ejercicio (T3) y a los 30 minutos pos ejercicio (T4). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.22. Puede observarse un incremento sostenido y significativo de las concentraciones de lactato, superando el umbral de lactato (4 mmol/l) en algún punto entre los 8,5 m/s (T1) y los 15 m/s (T2), manteniéndose elevados los valores aún hasta 30 minutos luego de terminado el ejercicio (T4). En la figura 3.22. puede observarse el comportamiento combinado de ambas variables durante el test de ejercicio. En ella puede observarse como a los 15 m/s el consumo de oxígeno y las concentraciones de

lactato en sangre alcanzan sus valores máximos, reflejando el esfuerzo metabólico energético.

Tabla 3.21. Valor medio de consumo de oxígeno (VO_{2max}) en equinos SPC durante el test de ejercicio.

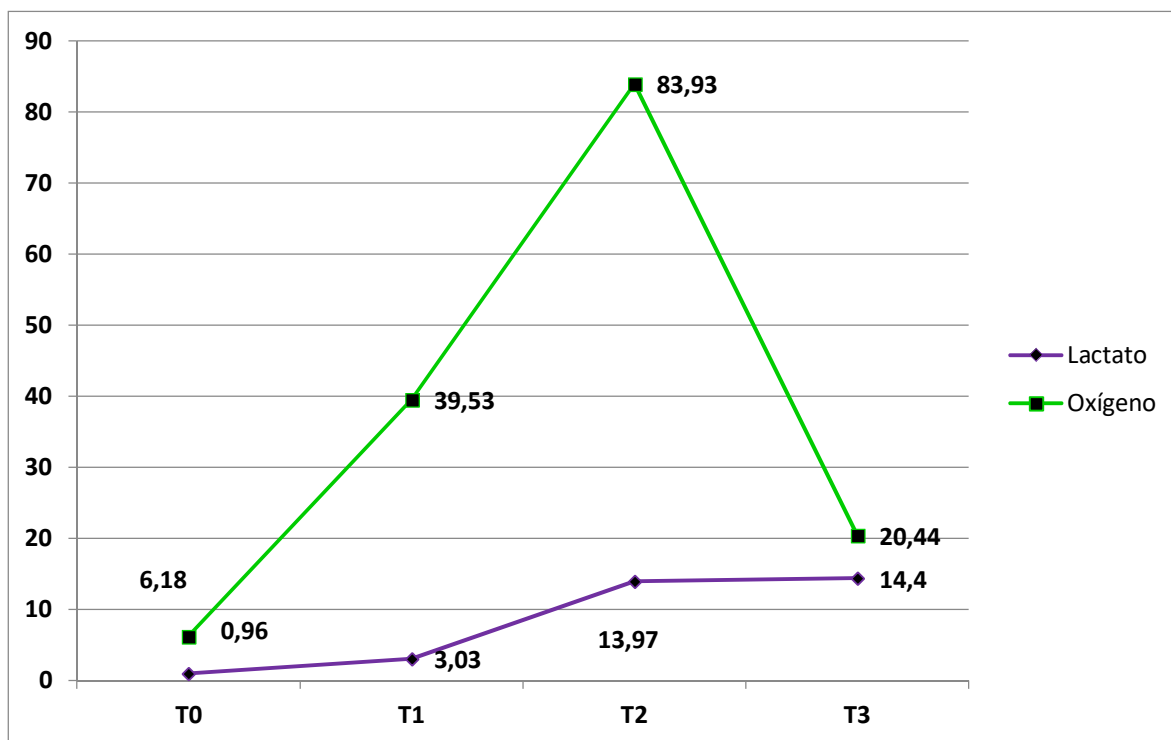
Velocidad (m/s)	VO_{2max} medio (l/minuto)	± DS
1,7	6,183	1,613
4	16,361	3,126
6,5	26,044	7,981
8,5	39,530	12,310
10,5	54,098	14,685
12,5	70,0344	14,512
15	83,930	6,540
4	36,836	3,953
1,7	20,440	4,364

Tabla 3. 22. Concentración de lactato en sangre en equinos SPC durante el test de ejercicio.

Tiempo de muestreo	Lactato (mmol/l)
T0	0,96 (± 0,15) ^a
T1	3,03 (± 1,47) ^b
T2	13,97 (± 0,85) ^c
T3	14,14 (± 1,36) ^c
T4	12,18 (± 4,19) ^c

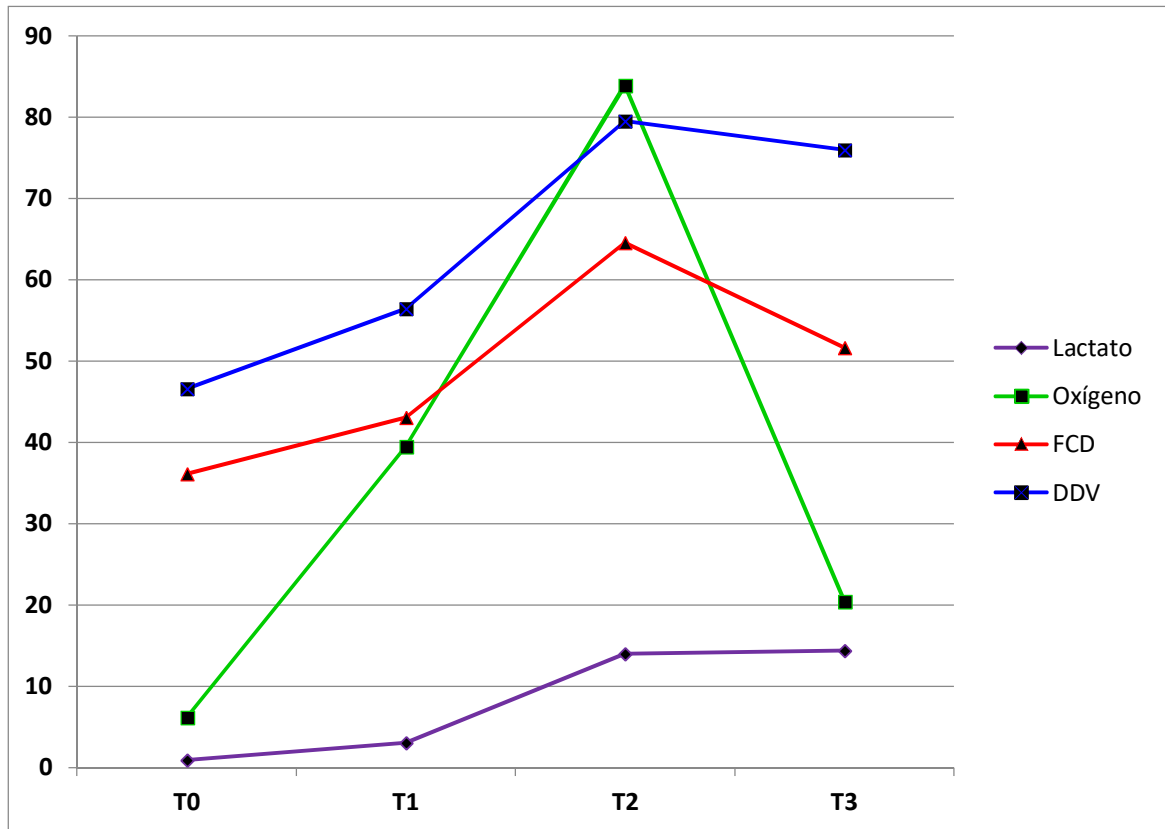
*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

Figura 3.22. Comportamiento de las variables “consumo de oxígeno” y concentración de lactato en sangre durante el test de ejercicio.



Como puede observarse en la figura 3.23., la mayor intensidad de daño en el ADN y la mayor frecuencia de células con daño en el ADN coinciden con los mayores niveles de lactato en sangre y con los mayores valores de consumo de oxígeno. La correlación entre las mencionadas variables y los consumos de oxígeno y concentración de lactato fueron de: Oxígeno-DDV, 0,65 ($R^2= 0,429$); Oxígeno-FCD, 0,859 ($R^2= 0,739$); Lactato-DDV, 0,98 ($R^2= 0,968$); Lactato-FCD, 0,88 ($R^2= 0,77$) y Oxígeno-lactato, 0,52 ($R^2= 0,27$).

Figura 3.23. Relación existente entre consumo de oxígeno, concentración de lactato en sangre, DDV y FCD.



4. DISCUSIÓN:

Cada vez hay más evidencia de que los caballos están expuestos a cambios inducidos por el ejercicio en el balance oxidante/antioxidante, dependiendo del tipo de ejercicio, intensidad y duración del mismo, nivel de entrenamiento, condiciones ambientales, y la presencia de enfermedades (Williams C.A y col. 2005; Williams C.A y col 2012). En la especie equina la ocurrencia de estrés oxidativo inducido por el ejercicio ha sido bien demostrada (Hargreaves y col. 2002a; Kirschvink y col. 2002c). Tanto el entrenamiento como el ejercicio inducen la producción de especies reactivas de oxígeno las cuales causan daño celular y de los tejidos (Clarkson y Thompson, 2000). El enfoque más común que se utiliza para evaluar el estrés oxidativo originado por el ejercicio implica la medición del aumento de uno o más biomarcadores moleculares de daño oxidativo. Específicamente, muchos estudios han documentado el estrés oxidante inducido por el ejercicio mediante la medición de daño oxidativo a los componentes celulares (lípidos, proteínas, y/o ADN). El primer informe que documenta el estrés oxidativo inducido por el ejercicio en los seres humanos lo publicaron Dillard C. J. y col en 1978. Este trabajo reveló que 60 minutos de ejercicio de resistencia al 60% de VO_{2max} se traduce en mayores niveles de pentano espirado (biomarcador de la peroxidación lipídica) y que la suplementación con un antioxidante como la vitamina E redujo la producción de pentano tanto en reposo como en ejercicio. Los autores concluyeron que el ejercicio promueve el aumento de la producción de oxidantes pero la fuente de estos no fue identificada. Desde esta temprana observación, muchos estudios que utilizan animales y seres humanos han demostrado que una variedad de

intensidades y modos de ejercicio (por ejemplo andar en bicicleta, carreras de velocidad y ejercicios de resistencia) resultan en un aumento de los biomarcadores de daño oxidativo en sangre y músculo esquelético (Sentürk. Ü. K. y col. 2001; Marlin D.J. y col. 2004; Powers, S. K. y Jackson, M. J. 2008, Williams, C. A., 2014, Piergiacomi, V. y col 2008, Muriel MG. y col. datos no publicados).

Entre los biomarcadores de daño oxidativo la peroxidación lipídica y el daño en el ADN son de los más utilizados (Marlin D.J.M y col. 2004, Kirschvink N. y col 2008). Existen numerosas publicaciones previas en las cuales animales o humanos sometidos a diferentes niveles de ejercicio expresaron daño en el ADN, muchos de ellos incluso, utilizando la misma metodología que la utilizada en el presente trabajo (ensayo cometa).

Tice y col. (1990) fueron los primeros en informar el efecto del ejercicio utilizando como metodología el ensayo cometa. Después de correr 5 kilómetros, una de las tres personas muestreadas tenía un mayor nivel de daño en el ADN en la muestra de sangre obtenida 5 min después de la carrera. Hartmann y col (1994) estudiaron la presencia de intercambios de cromátides hermanas (SCE, del inglés "sister chromatid exchanges") y daño en el ADN utilizando el ensayo cometa (SCGE, del inglés "single cell gel electrophoresis") para estudiar el efecto de la actividad física sobre dicha molécula en los linfocitos de 3 voluntarios humanos, después de una carrera de 6 horas en una cinta rodante. Los individuos fueron muestreados para bioquímica sanguínea, electrocardiografía, concentración de lactato y actividad de CPK. Se observó aumento de la migración del ADN en leucocitos de una de estas personas. Sin embargo no hubo un aumento significativo en SCE. La migración del ADN alcanzó su máximo después de 24 horas, pero disminuyó gradualmente a la del nivel de control después de 72

h. Sen y col. (1994) detectaron una asociación entre una sola sesión de ejercicio y la inducción de roturas en la cadena de ADN de leucocitos, utilizando un análisis fluorométrico de ADN desenrollado. En este estudio, dos ejercicios sub-máximos se llevaron a cabo separados siete días uno del otro, con una duración de 30 min. Las muestras de sangre fueron tomadas antes y 2 min después de cada ejercicio, observándose inducción de daño en el ADN en 13 de las 18 muestras. Hartmann y col. (1995) también utilizaron el ensayo cometa para estudiar el daño del ADN en PBMC de sujetos humanos después de una sola sesión de ejercicio exhaustivo y también para estudiar el efecto de la suplementación con vitamina E. Las muestras de sangre fueron tomadas antes y 24 horas después de la carrera y se encontraron con un aumento de la rotura de cadena de ADN en todas las muestras. Sin embargo después de la suplementación con vitamina E (1200 mg) se observó entre los voluntarios una clara reducción en el daño del ADN inducido por el ejercicio, sugiriendo el efecto oxidante del esfuerzo físico.

Schiff y col. (1997) llevaron a cabo la prueba de MN, en linfocitos de sangre periférica de seis humanos sanos antes y después de dos sprints exhaustivos. Las concentraciones de lactato en sangre periférica fueron entre 9,6 y 12,4 mmol / L y el número de micronúcleos se incrementó significativamente después de 24-48h en los seis sujetos. Los valores medios de todo el grupo también aumentaron de 37 MN por cada 3.000 células binucleadas antes del ejercicio a 56 y 55 MN 24h y 48h después del ejercicio, respectivamente. Estos resultados llevaron a la conclusión de que el ejercicio físico exhaustivo causó mutaciones severas a nivel cromosómico en linfocitos de sangre.

Hartmann y col. (1998) llevaron a cabo un estudio para determinar los efectos de un triatlón de corta distancia en la inducción de alteraciones del ADN

en leucocitos periféricos, en la excreción urinaria de bases de ADN oxidadas, y de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de voluntarios humanos. Usando el ensayo cometa versión alcalina, la inducción de efectos en el ADN se midió como el aumento de la migración del ADN en leucocitos de todos los individuos en diferentes puntos temporales después del ejercicio y los resultados revelaron un patrón bifásico. La migración del ADN elevada se encontró 24 h post-ejercicio mientras que los valores más bajos se detectaron 48h después del ejercicio. Sin embargo, el máximo aumento de la migración de ADN fue encontrado 72 horas post-ejercicio. También utilizaron un protocolo modificado del ensayo cometa para la detección de bases oxidadas de ADN pero no revelaron diferencias en los leucocitos, antes y directamente después del triatlón. Además, no se encontraron diferencias en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos antes o 48h y 96h después del ejercicio. Sugirieron que los efectos de ADN detectados con el ensayo del cometa en los leucocitos de los seres humanos después del ejercicio son efectos secundarios que no se originan a partir de bases oxidadas de ADN y no resultan en daño cromosómico.

Demirbag y col. en 2006 investigaron los efectos agudos de una prueba de esfuerzo en cinta rodante (TET: Treadmil exercise test) sobre parámetros oxidantes/antioxidantes y el daño del ADN en 113 voluntarios humanos saludables y sin entrenamiento. Las muestras de sangre se obtuvieron antes y después de la TET. Se midieron el total de peróxido, TAC (total antioxidant capacity), Índice de estrés oxidativo (OSI = oxidative stress index), concentración de vitamina C y el daño del ADN. Luego del TET se detectó aumento de los niveles de peróxido totales (12 +/- 3 micromol H₂O₂/L a 14 +/- 3 micromol H₂O₂/L, p<0.001), del OSI (0.72 +/- 0.18 AU to 0.81 +/- 0.22 AU, p<0.001), y disminución

de TAC (1.78 ± 0.16 mmol Trolox Eq./L a 1.72 ± 0.15 mmol Trolox Eq./L, $p < 0.001$) y niveles de vitamina C (98 ± 4.2 micromol/L a 95 ± 3.4 micromol/L, $p < 0.001$). Determinando el cambio de equilibrio hacia el lado oxidativo, pero el esfuerzo no fue suficiente para producir daño en el ADN detectado por el ensayo cometa.

Después de exponer estos ejemplos sobre ensayos que vinculan diferentes tipos de ejercicios con el daño en el ADN, es posible destacar dos aspectos principales. En primer lugar, con mayor o menor intensidad todos los ensayos mencionados detectaron al menos un efecto genotóxico e incluso, en algunos casos, efecto clastogénico. En segundo lugar, y más relevante para el presente trabajo, podemos ver que el denominador común de estos fue la estimación del daño posterior al ejercicio y no durante el mismo. En tal sentido, uno de los objetivos de la presente tesis fue estudiar la cinética del daño en el ADN de leucocitos en sangre periférica durante y posteriormente a la fase de esfuerzo físico de máxima intensidad. Primero se planteó la posibilidad de demostrar la generación de daño oxidativo durante el ejercicio, para lo cual se evaluaron en el experimento 1 algunos biomarcadores de daño oxidativo tales como peroxidación y composición de lípidos de membrana en glóbulos rojos, el índice de insaturación de ácidos grasos (Piergiacomi, V. y col 2008) y el daño en el ADN de leucocitos circulantes durante un test de ejercicio de máxima intensidad. Dichos datos se acompañaron de información complementaria que incluyó la determinación de la actividad de enzimas musculares vinculadas al daño muscular y metabolitos relacionados a la actividad de la xantina oxidasa (urea).

En la presente tesis se pudo determinar la presencia de daño en la molécula de ADN de linfocitos de sangre periférica durante ambos protocolos de

ejercicio utilizados, alcanzando en ambos casos los máximos niveles de daño al llegar al punto máximo de esfuerzo, el cual coincidió con los máximos valores de consumo de oxígeno (VO_2 max) y de lactato en sangre, pero también en el experimento 1 con marcadores de incremento en la actividad peroxidativa en la sangre. Por lo tanto, por los resultados obtenidos tanto en el experimento 1 como en el 2, la principal conclusión fue que el daño en el ADN se produjo mayoritariamente durante el ejercicio y no después del mismo. Esto quedó especialmente evidenciado en el experimento 1 por la intensidad del daño (DDV), que fue marcadamente mayor (aunque no significativo) en el momento de máxima actividad física que al finalizar el test. La principal diferencia entre los valores obtenidos a nivel basal y los obtenidos durante y al finalizar el ejercicio se debieron básicamente al incremento en el porcentaje de células con bajo nivel de daño. A eso debe sumarse un incremento en el porcentaje de células con alto nivel de daño al finalizar el test de ejercicio.

En el experimento 2, coincidiendo con lo observado en el experimento 1, el daño en el ADN se produjo durante el ejercicio y especialmente durante el momento de máximo esfuerzo. Sin embargo, debido a la reformulación del modelo experimental, fue posible establecer la existencia de un comportamiento bifásico con un segundo pico de intensidad de daño establecido en este modelo a los 30 minutos pos ejercicio. En este caso la frecuencia de células con daño se incrementó hasta alcanzar los equinos la máxima velocidad (15 m/s), momento en el cual el aumento fue casi de un 30%. Al término del ejercicio, se produjo una leve reducción en el número de células dañadas y finalmente, se observó un nuevo aumento a los 30 minutos de terminado el ejercicio. Al igual que la frecuencia de células con daño, la intensidad del daño en el ADN alcanzó su

máximo valor en coincidencia con el máximo esfuerzo. Sin embargo, a partir de este momento la intensidad del daño se redujo sustancialmente, incluso siendo menor la intensidad a los 30 minutos pos ejercicio. El hecho de que ambas variables (DDV y FCD) no presentaran comportamientos similares puede explicarse a partir de la observación del comportamiento de las células con sus diferentes niveles de daño. Como ya habíamos observado en el experimento 1, durante el experimento 2 el grueso de las células afectadas correspondía a aquellas con mínimo nivel de daño en el ADN (células grado 2), siendo estas el componente principal de la frecuencia de células con daño, lo cual explica la similitud encontrada entre las curvas de ambas variables (figura 3.20). Por el contrario, el sostenimiento de la intensidad del daño en el ADN a lo largo del tiempo se correspondió con la aparición de células con mayores niveles de daño, las cuales aumentaron su número a medida que progresa el test de ejercicio. Como puede observarse en la figura 3.21, la intensidad del daño a 15 m/s estuvo dada básicamente por la acumulación de gran cantidad de células con mínimo nivel de daño mientras que al finalizar el ejercicio la intensidad de DDV es apenas menor pero el patrón de células dañadas varió sustancialmente, reduciéndose la participación de las células grado 2 y aumentando la participación de aquellas con moderado o intenso daño en el ADN (grados 3, 4 y 5). Finalmente, 30 minutos pos ejercicio, es nuevamente la participación de células con bajo nivel de daño quienes determinan la intensidad de DDV.

En coincidencia con observaciones realizadas por otros autores (Sentürk, Ü. y col. 2001, Piergiacomi, V. y col 2008), durante el experimento 1 observamos la existencia de modificaciones estructurales en las membranas de los eritrocitos de los equinos sometidos a esfuerzo físico. Respecto de la composición de los

lípidos de membrana y la peroxidación de los mismos durante el ejercicio nuestros datos concuerdan con los obtenidos en trabajos realizados por Piergiacomi, V. y col 2008, donde podemos observar una disminución en los PUFAs y un aumento de los ácidos grasos saturados durante el máximo esfuerzo y en la fase de recuperación post ejercicio inmediata. Como mencionamos previamente (apartados 1.1.6.2 y 1.1.8.1) los lípidos, y en especial los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) son un blanco fácil para el accionar de los ROS. En nuestro trabajo la cantidad de ácidos grasos mono-insaturados prácticamente no experimentó modificaciones durante el ejercicio. Sin embargo, los poli-insaturados sufrieron una drástica y significativa reducción, representando el 33,28% de los ácidos grasos de membrana al inicio de la prueba, para reducirse constantemente hasta alcanzar un valor inferior al 13% al final de la prueba. Este fenómeno se diferencia claramente del comportamiento observado en el ADN, donde la mayor intensidad de daño se registró en el punto máximo de ejercicio, y se debe probablemente al mecanismo trifásico previamente descrito de generación y propagación del daño peroxidativo, en el cual una vez desencadenado el fenómeno, el proceso no termina hasta que se oxidan todas aquellas moléculas oxidables. Estos resultados fueron corroborados por la inversión de la relación de ácidos grasos saturados/insaturados y del índice de insaturación, el cual cayó drásticamente de 97,36 a 55,8 al final de la prueba, pero especialmente por el comportamiento de peroxidación determinado por quimioluminiscencia, en la cual la misma se redujo de 96053 a 60619 cpm al finalizar el test. Como se mencionó en la correspondiente sección de resultados, estos hallazgos sugieren claramente el ambiente pro-oxidante reinante en la sangre durante el ejercicio de alta intensidad, pero además sugieren la persistencia de la condición pro-oxidante a lo

largo de todo el test. Probablemente en un principio asociado a la liberación de ROS, pero seguida secundariamente por la liberación de RL producto de la peroxidación de lípidos de membrana.

La correlación entre la peroxidación lipídica (LPO) y el aumento en la concentración de lactato demuestra una posible relación entre la intensidad del ejercicio y la oxidación de los lípidos datos que se correlacionan con los resultados encontrados por Williams C.A. y col. en 2008. Hay evidencia que el ejercicio intenso aumenta la peroxidación de lípidos, varios estudios que utilizan pruebas de carreras simuladas en o por encima de la frecuencia cardíaca máxima (FCmax) han demostrado aumento de la peroxidación lipídica en las muestras tomadas después del ejercicio en comparación con los niveles pre-ejercicio (Mills P.C. y col. 1996; Chiaradia E. y col. 1998; White y col 2001).

Es interesante mencionar que Williams y col. 2004^a ejercitando caballos por larga duración y baja intensidad de ejercicio y sin añadir modificaciones en esta última no pudieron crear un aumento del estrés oxidativo. En ese estudio, los niveles de peroxidación lipídica en respuesta a la prueba de esfuerzo no fueron diferentes entre el grupo suplementado (vitamina E) y el grupo de control.

Según los resultados obtenidos en este experimento pudimos establecer que claramente se produce daño en el ADN de leucocitos periféricos durante el ejercicio de máxima intensidad y que debido a la existencia de otros biomarcadores que sugieren un desbalance oxidativo/antioxidante, inferimos que dicho daño es de tipo oxidativo. Es importante destacar que según la capacidad de observación proporcionada por el modelo de ejercicio aplicado en el experimento 1, tanto la intensidad del daño en el ADN como la cantidad de células afectadas coincidieron con el punto de máximo esfuerzo físico, experimentando

ambas variables reducciones no significativas al momento de finalizar el test de ejercicio. Ambos hallazgos coincidieron también con el máximo consumo de oxígeno y con la máxima concentración de lactato en sangre. De hecho, tanto la variable oxígeno como la variable lactato presentaron buenos niveles de correlación con la variable daño, lo cual incorporaría al planteo teórico la participación del lactato en la génesis del mismo. Sin embargo, como se mencionó previamente en el marco teórico, la participación del lactato es meramente causal, secundaria al agotamiento de la capacidad oxidativa para generar energía y se descartó su participación como agente genotóxico dada su inocuidad (apartado 1.1.5.1.2.). Es importante mencionar que durante el máximo esfuerzo el incremento en el consumo de oxígeno fue de 14,55 veces (61,44 l/min.), el valor hematocrito ascendió de 35 a 54% y la concentración de leucocitos aumento un 14%. Todos estos factores deben ser tenidos en cuenta a la hora de analizar las causas del daño en el ADN ya que indican que debido a la demanda metabólica provocada por el esfuerzo sobre el músculo, las condiciones reinantes en la sangre implicaron la presencia de una gran cantidad de oxígeno y una gran cantidad de células potencialmente productoras de ROS, como leucocitos y glóbulos rojos. Con la excepción de los leucocitos, capaces de verter a la sangre directamente sus RL, el oxígeno en sí mismo tampoco sería perjudicial, pero está reflejando la alta demanda muscular del mismo y por ende la producción de mayores cantidades de $O_2^{\bullet-}$ por las vías previamente descritas en el apartado 1.1.6.3, los cuales finalmente también pueden alcanzar la sangre y hacer contacto con los elementos formes, causando daño tanto sobre los eritrocitos como sobre los leucocitos. Como se describió previamente, una posible excepción, relacionada a la alta concentración sanguínea de oxígeno, sería la

oxidación del hierro y los grupos hemo, capaces de generar RL, pero secundariamente a un ataque previo, probablemente por leucocitos activados.

Los resultados obtenidos en el experimento 1, si bien nos permitieron asociar con claridad el daño en el ADN a daño de tipo oxidativo, no nos permitían evaluar que ocurre una vez que las condiciones pro-oxidantes iniciales cesan abruptamente. Es por ello que planteamos un segundo protocolo de ejercicio, de mayor intensidad y con mayor número de puntos de observación, para establecer específicamente una curva más clara de cinética de daño en el ADN. Con este modelo pudimos demostrar que la cinética del daño en el ADN equino tiene un patrón característico durante un ejercicio de alta intensidad en cinta ergométrica, evidenciando claramente dos momentos bien diferenciados uno del otro. Su máxima expresión se produce al momento de llegar los equinos a la máxima velocidad (15 m/s). Este punto de mayor intensidad de daño, al igual que en el experimento 1, coincidió con el VO_{2max} , con el aumento máximo del hematocrito y la concentración máxima de lactato sanguíneo. El siguiente de menor cuantía se manifestó mientras se llevaba a cabo la fase de recuperación, 30 minutos luego de finalizado el esfuerzo.

El primer aspecto a destacar de este modelo es que corroboró el hecho de que una vez finalizado el ejercicio los valores de daño en el ADN se encuentran por encima de los valores basales, lo cual concuerda con los múltiples hallazgos mencionados al inicio de esta discusión, en los cuales tras el ejercicio los animales o personas presentaban mayores niveles de daño en el ADN. El segundo aspecto relevante es que si bien durante el momento de máxima intensidad del ejercicio tanto la cantidad de células dañadas como la intensidad del daño fueron máximos, a partir de este momento, la intensidad del daño

experimentó un descenso constante, mientras que la frecuencia de células dañadas primero se redujo y luego volvió a aumentar 30 minutos pos ejercicio.

El hecho de que en el momento en que se produce el ejercicio se haya observado la mayor frecuencia de células con migración del ADN y la mayor intensidad del daño demuestra que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el máximo esfuerzo físico. Dado que al momento de terminar el ejercicio los valores de daño son menores a los observados a 15 m/s, puede sugerirse que en ese lapso hay una intensa actividad de reparación del daño en el ADN, que tiene como consecuencia una marcada reducción del daño en el material genético. Esta hipótesis se correspondería con las observaciones y conclusiones obtenidas por Inoue T. y col. (1993). Los mencionados autores llevaron a cabo un estudio para averiguar el efecto del ejercicio sobre la formación de 8-OHdG, biomarcador de daño oxidativo del ADN, y de los metabolitos de purina tales como hipoxantina, xantina y ácido úrico. Sangre y orina venosa se recogieron de los corredores de distancia y nadadores antes y después del entrenamiento habitual y la cantidad observada de 8-OHdG obtenidos a partir de ADN nuclear de los linfocitos disminuyeron notablemente después de nadar intermitentemente, así como después de las carreras de fondo. Las concentraciones plasmáticas de hipoxantina, xantina y ácido úrico aumentaron significativamente después de cada ejercicio. Sin embargo, aunque la excreción urinaria de hipoxantina aumentó, el de la xantina y ácido úrico disminuyó después del ejercicio. Después de nadar o correr, la 8-OHdG de creatinina en orina aumentó. Así, los autores concluyeron que la reparación de daño oxidativo del ADN se ve aumentada por el ejercicio. Por otra parte, estudios realizados en 1984 por Van Zeeland en células de mamíferos demostraron que,

tras inducir daño con rayos x y γ , la eficacia de la reparación permite a las células recomponer el 80% de las lesiones en la molécula de ADN entre 5 y 10 minutos post exposición, mientras que el 20% restante se repara pocas horas después. Estos hallazgos son concordantes con lo observado en el presente trabajo ya que entre la aparición del máximo nivel de daño y la reducción significativa del mismo transcurrieron 6 minutos. Si este razonamiento es correcto, debemos asumir entonces que una segunda fuente de daño genotóxico genera el posterior aumento significativo del daño en el ADN observado 30 minutos pos ejercicio.

Los mecanismos por los cuales el ejercicio de alta intensidad puede inducir daño en el ADN incluyen la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el mecanismo de isquemia-reperfusión, reacción catalizada por la xantina oxidasa, el mecanismo inflamatorio y la producción de catecolaminas (Hartmann y Niess 1999). Estos mecanismos, descritos previamente, pueden actuar de forma sinérgica y también es probable que algunos de ellos contribuyan en magnitud diferente según el tipo de ejercicio realizado y la intensidad aplicada (Finaud J y col. 2006).

Muchos tejidos pueden producir ROS durante el ejercicio (Powers, S. K. y Jackson, M. J. 2008). Sin embargo, hasta la fecha, pocos estudios han investigado cuáles órganos son los principales responsables de la producción de ROS durante el ejercicio en seres humanos y animales. Desde que Davies K.J. y col en 1982 demostraron que los músculos esqueléticos al contraerse producen ROS, muchos investigadores han asumido que el músculo esquelético proporciona la principal fuente de generación de radicales libres y ROS durante el ejercicio (Powers, S. K. y Jackson, M. J. 2008). Williams y col. (2004 b) evaluaron el desarrollo de estrés oxidativo y los efectos de la suplementación antioxidante

en una competición de endurance de 80 km. Luego de la competencia detectaron incremento en los biomarcadores de estrés oxidativo como la glutatión peroxidasa de glóbulos rojos, glutatión total de leucocitos sanguíneos, hidroperóxidos lipídicos, CPK y AST, mientras que el glutatión total de glóbulos rojos y glutatión peroxidasa de glóbulos blancos disminuyeron su actividad con la distancia ($P < 0,001$). Se encontraron correlaciones positivas entre hidroperóxidos de lípidos en plasma, CPK ($r = 0,25$; $p = 0,001$) y AST ($r = 0,33$; $p < 0,001$). Estos resultados permitieron establecer una asociación entre fugas musculares de ROS y un índice acumulativo de estrés oxidativo. En el presente trabajo la actividad CPK intento utilizarse como un marcador de daño muscular y la concentración de urea como un indicador de actividad XO. En cuanto a las concentraciones de urea, al no presentar diferencias significativas no permitieron realizar inferencias precisas en cuanto al comportamiento de la XO y su rol en la generación de RL, aunque por supuesto no permitieron descartar a la misma como fuente de generación. En cuanto a la CPK, la actividad media de dicha enzima se incrementó significativamente cuando fue medida 12 hs pos ejercicio, descendiendo a valores similares a los basales a las 24 hs de finalizada la prueba. Sin embargo, un análisis pormenorizado del comportamiento de la CPK a lo largo de los 4 ensayos en la que fue medida muestra claramente que en 3 de ellos, el incremento o no existió, o no fue significativo, por lo cual su valor fue de relativa utilidad. Pese a ello, conocemos que una serie de cambios ocurren a nivel muscular durante el ejercicio y que dichos cambios pueden generar alteraciones y daño de las fibras musculares y de los tejidos periféricos. Entre ellos la producción excesiva de ROS. El estrés oxidativo inducido por el ejercicio contribuye con la aceleración de la fatiga muscular y el daño de las fibras musculares (Sen y Parcker, 2000).

El ejercicio de alta intensidad, se caracteriza principalmente por una alta acidosis muscular (Art T., Lekeux P. 2005, Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008). Esto se debe a la producción de cantidades significativas de iones libres de hidrógeno y lactato, productos del metabolismo anaerobio, los cuales al acumularse en el citoplasma celular descienden el pH intramuscular a valores menores de 6,5 (Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008). La habilidad para remover o tamponar los iones hidrógeno y el lactato desde las células se convierte en un fenómeno muy importante (Valberg S. J. 1996). Esto ocurre por la difusión y el transporte activo del lactato a la circulación general y por el tamponamiento (buffering) de los iones de hidrógeno por parte del bicarbonato (HCO_3^-), proteínas, fosfatos y el dipéptido carnosita (beta alanina + l-histidina) (Pösö 2002; Valberg S. J. 1996). Los hidrogeniones provenientes de la hidrólisis del ATP durante el máximo esfuerzo son los que realmente producirían el descenso del pH intracelular (acidosis láctica) y serían los causantes de fatiga (Rivero, J.L. y Piercy, R.J. 2008). La generación de lactato no solo depende de la disponibilidad de O_2 , sino que hay otros varios factores que intervienen, entre los que encontramos el tipo de fibra, la velocidad de la glucogenolisis muscular, la dieta, el nivel de entrenamiento y el nivel de catecolaminas circulantes (Boffi F.M. 2006). Como mencionamos previamente, durante muchos años se creyó que el lactato era un metabolito de desecho de la glucólisis, generado en situaciones de isquemia o durante los ejercicios de máxima intensidad y que era nocivo para la célula. Hoy se sabe que es inocuo para el organismo y que es un importante metabolito intermediario en la gluconeogénesis hepática, así como también que es utilizado por el músculo cardíaco y por las fibras oxidativas del músculo esquelético como sustrato energético durante la contracción muscular.

En tal sentido, las altas concentraciones de lactato en sangre encontradas en correlación con el daño en el ADN observados en ambos experimentos deben ser interpretados como el resultado de la insuficiencia de los mecanismos aeróbicos para generar la energía necesaria para sostener el esfuerzo físico y no como una asociación nociva entre ambas variables. De hecho, Groussard C. y col. 2000 hipotetizan sobre el aspecto beneficioso de lactato al sugerir que el ion lactato puede ser considerado como un agente antioxidante potencial, mediante la demostración de que el ión lactato, in vitro, no es pro-oxidante. Estos autores demostraron que el lactato fue capaz de secuestrar ambos $\text{HO}\cdot$ y $\text{O}_2\cdot^-$, in vitro, siendo el efecto predominante sobre el $\text{O}_2\cdot^-$. Esta capacidad antioxidante de lactato podía ser muy importante en relación con el rendimiento del ejercicio. Por secuestro de $\text{O}_2\cdot^-$, el ion lactato podría limitar el alto aumento inducido por el ejercicio en la producción de ROS. Al secuestrar tanto $\text{O}_2\cdot^-$ y $\text{HO}\cdot$, el lactato puede limitar la etapa de iniciación de la peroxidación lipídica y así proteger a las células contra el daño oxidativo. Los mecanismos precisos aún no se han dilucidado. Pese a ello, no se observó ningún efecto de secuestro de lactato hacia los radicales lipídicos.

Durante el ejercicio la demanda de O_2 muscular aumenta significativamente y es cubierta por un incremento en el flujo de sangre al músculo de hasta 20 a 30 veces como consecuencia de la apertura del lecho capilar (Armstrong R.B. y col. 1992). Es así que en el equino durante un ejercicio que alcanza el $\text{VO}_{2\text{max}}$ el flujo sanguíneo muscular total ha sido estimado en 226 l /min, lo que representa aproximadamente el 78% del total del gasto cardíaco (Armstrong R.B. 1992). Para poder responder a esta demanda aumentada de sangre de los músculos esqueléticos activos y de la piel, se produce un hecho denominado redistribución

del flujo sanguíneo. La volemia es desviada desde los órganos de menor actividad (ej. riñones, región esplácnica) hacia los de mayor actividad, generando el ejercicio intenso una hipoxia tisular transitoria en varios órganos (Adams y Best 2002). Por otro lado a nivel muscular se genera una vasodilatación local lo que permite el mayor aporte sanguíneo a las fibras musculares, esto es gracias a la acción del sistema nervioso autónomo y a la presión generada por la alta presión sanguínea, y a la liberación local de mediadores vasoactivos como el ON (óxido nítrico), el K⁺ y la adenosina (Boffi F.M. 2006). Estos fenómenos producen por un lado un aumento en la volemia muscular y por el otro un aumento en la tasa de pasaje, lo que genera mayor contacto con las células sanguíneas, siendo este un punto a tener en cuenta en la fisiopatogenia del daño oxidativo en los elementos formes de la sangre al tener mayor contacto los mismos con los metabolitos generados por el músculo durante el ejercicio máximo.

Los cambios hemodinámicos durante el ejercicio están vinculados a garantizar el mayor aporte posible de oxígeno a la fibra muscular (aumento de FC, aumento de concentración de hemoglobina, aumento del hematocrito). Esto es coincidente con nuestros hallazgos durante los test de esfuerzo máximo. Como observamos en la presente tesis el VO_{2max} coincide con el máximo esfuerzo. Esto es debido a la mayor demanda de O₂ por parte de las fibras musculares.

La producción de ROS por la cadena transportadora de electrones mitocondrial es posiblemente la principal responsable del pico de daño en el ADN observado durante la fase de máxima intensidad de ejercicio en el equino. Ha sido informado que el ejercicio físico extenuante puede inducir estrés oxidativo debido a la absorción excesiva de oxígeno y elevada generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el sistema de transporte de electrones mitocondrial, así

como reacciones catalizadas por enzimas tales como la xantina oxidasa y la NADPH deshidrogenasa (Williams C.A. y col. 2005; Deaton CM y Marlin DJ 2003). El incremento en la producción mitocondrial de ROS por el ejercicio se basa en el hecho de que el consumo de oxígeno de los tejidos y de todo el cuerpo aumenta de manera espectacular durante el ejercicio de máxima intensidad (Williams C.A. y col. 2005; Kirschvink N y col. 2008), hecho que coincide con los resultados obtenidos en todos nuestros ensayos. Cabe mencionar que entre las especies animales de deporte atlético, el caballo tiene una capacidad única para aumentar su VO_{2max} unas 40 – 60 veces en todo el cuerpo durante el ejercicio intenso (Evans D. and Rose R., 1988; Kinding C.A. y col. 2001). A esto debemos sumarle el mayor número de mitocondrias por kg de músculo, que presenta el equino con respecto a otras especies del mismo peso como el bovino (Kayar S.R. y col 1989), lo que determina una mayor capacidad oxidativa en el primero. Por otro lado hay que resaltar que el requerimiento de O_2 a nivel de la fibra muscular lo hace unas 100 veces durante el ejercicio máximo (Ames y col. 1995), determinando una mayor captación de O_2 y por ende un aumento proporcional de la actividad en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, lo que a su vez puede aumentar la liberación de ROS durante la transferencia de electrones mitocondrial (2% -5% del consumo de oxígeno mitocondrial) (Williams C.A. y col. 2005; Kirschvink N y col. 2008), incrementándose la producción de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Gandhi y Gunjan, 2009), el cual tiene amplia capacidad de difusión a través de las membranas plasmáticas (Picco S.J. 2004). El porcentaje de O_2 que se convierte en radical superóxido (2- 5 %) se mantiene, pero en términos absolutos hay un incremento en la producción de ROS (Gandhi y Gunjan, 2009). El daño oxidativo mitocondrial apoya la hipótesis de que las mitocondrias son el

sitio principal de la generación de ROS durante el ejercicio. Luego de un ejercicio extenuante, la respiración se incrementa en las mitocondrias de los músculos, del hígado (Grollman y Moriya, 1993), y del corazón (Ji y col. 1994), indicando una posible alteración de la membrana interna mitocondrial (Gandhi y Gunjan, 2009).

Por otro lado, el ejercicio de alta intensidad produce un entorno celular en favor de la activación de la vía XO (Hellsten 1994). Durante el ejercicio realizado a intensidades muy altas, las fibras musculares pueden sufrir hipoxias relativas, ya que el aporte de oxígeno no puede satisfacer los requerimientos de energía (Insua M. F. 2003). La hipoxia tisular, a través de la vía de la xantina oxidasa (XO) (Ostenburg y col. 1997), puede generar estrés oxidativo durante el ejercicio (Moller P. y col. 2001). Viña J. y col. (2000) demostraron que el ejercicio provoca un aumento en la actividad de la xantina oxidasa plasmática en animales y humanos. Tal aumento puede causar un significativo incremento en la producción de superóxido en el lecho vascular. En el mismo ensayo observaron que radicales libres se redujeron significativamente, en animales y humanos, luego de la adición de allopurinol, un inhibidor de la XO. Según algunos autores, la XO podría ser más importante que la mitocondria como fuente de radicales libres producidos por el ejercicio (Viña J. y col. 2000; Moller P. y col. 2001; Insua M. F. 2003).

Al término del ejercicio, ocurre la re-oxigenación de los tejidos, la cual puede estar asociada con la producción de ROS. Una manera en la cual la reperfusión podría conducir a un incremento en la producción de ROS es a través de la conversión de la xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XO). Se ha informado que las concentraciones en sangre de hipoxantina y xantina aumentan dramáticamente en humanos después del ejercicio intenso (Sahlin y col. 1991; Inoue T. y col. 1993). La producción de ROS vía este mecanismo

conduce a estrés oxidativo tras el ejercicio, y no estaría restringida al músculo esquelético (Insua M. F. 2003).

Por otro lado las células blancas fagocíticas pueden jugar un papel importante en la modificación de estado redox muscular después del daño muscular inducido por el ejercicio (Katsuhiko Suzuki y col. 1999). De hecho, un grave perjuicio a las fibras musculares se acompaña de invasión de la zona lesionada con macrófagos y otras células fagocíticas (Nikolaidis M. G. y Jamurtas, A. 2009) y, aunque este proceso podría ser esencial para la reparación muscular eficaz, también implica la liberación de cantidades sustanciales de ROS de las células fagocíticas (Malech, H. L. y Gallin, J. I. 1987; Suzuki K. y col. 1999). La lesión-contracción (mecánica) inicial inducida puede ser seguida por el daño tisular secundario o aparición retardada como parte del proceso de reparación (Zerba E. y col. 1990). Varios cambios fisiológicos detectados después de la lesión muscular mecánica pueden asemejarse a las que se observan en la inflamación aguda, como el aumento de la temperatura corporal, aumento del número de granulocitos circulantes, aumento de la concentración de factores séricos como la interleuquina - 1 y proteínas de fase aguda (Smith y col. 1990; Smith, 1991). La lesión inicial es de origen mecánico y resulta en la activación de polimorfonucleares (PMN) neutrófilos (Benoni y col.1995) y estas células se infiltran en los sitios de daño muscular y liberan cantidades sustanciales de radicales de oxígeno y otros agentes reactivos como parte del proceso de fagocitosis, que puede conducir además a daño tisular secundario (Ebbeling C.B. y Clarkson P.M. 1989). La infiltración de macrófagos posterior observada en el sitio de la lesión se eleva de manera constante y se mantiene a través de varios días después del ejercicio (Smith 1991). Es también probable que el daño en el

ADN en leucocitos después del ejercicio sea inducido debido a una liberación secundaria de productos reactivos por las células inflamatorias activadas como neutrófilos y macrófagos (Wiseman H. y Hallwell B. 1996). En ensayos in vitro se ha observado que los neutrófilos activados inducen daño prolongado en el ADN en células co-cultivadas (Shacter E y col. 1988) y juegan un rol causal determinante en la inducción de la elevada migración del ADN en el ensayo cometa (Betancourt y col. 1995).

Al margen de las lesiones musculares, no menos importantes son las condiciones internas adversas que se producen durante el ejercicio y que afectan a otros tejidos y células, muchas de las cuales están distantes del sitio de origen de la lesión o bien solo tienen un contacto circunstancial. En este último caso las células de la sangre se encuentran entre las más expuestas debido a las condiciones circulatorias reinantes durante el ejercicio. Como se mencionara anteriormente debe tenerse en cuenta que durante el ejercicio hay aumento en la tasa de pasaje - más veces y más cantidad por unidad de tiempo-; por otro lado hay un ingreso al torrente sanguíneo de metabolitos derivados de la propia actividad muscular: lactato, mediadores de la inflamación, proteínas de fase aguda, CPK, ROS y NOS, entre otros. Es así que el ejercicio induce una multitud de cambios fisiológicos y bioquímicos en la sangre que pueden afectar en última instancia su estado redox (Nikolaidis, M. G. y Jamurtas, A. 2009). Algunos de los eventos bien descritos que surgen en la sangre durante el ejercicio son los aumentos de temperatura (Nybo L. y col. 2002), la disminución de pH (Hermansen L., Osnes J.B. 1972), la disminución de la presión parcial oxígeno (Stringer W. y col 1994), el aumento de la concentración de lactato (Stringer W. y col 1994) y el aumento total de peróxidos (Demirbag y col. en 2006).

Estas condiciones ambientales del medio interno generadas por el ejercicio parecen ser las principales responsables del daño experimentado por los elementos formes de la sangre. El daño, si bien puede considerarse remoto, es producido entonces por el paso de los elementos de la sangre por las áreas de actividad metabólica intensa y de generación de ROS (músculo). No solo los músculos sino también otros tejidos tales como el corazón, pulmones o la sangre pueden contribuir a la generación total de ROS del cuerpo durante el ejercicio (Powers, S. K. y Jackson, M. J. 2008, Nikolaidis, M. G. y Jamurtas, A. 2009). Debe tenerse en cuenta además que durante el ejercicio existe una producción intrínseca de ROS por parte de los elementos formes de la sangre que puede incrementar el daño (Nikolaidis M. G. y Jamurtas A. Z. 2009).

Tras el ejercicio, la producción de $O_2^{\bullet-}$ por acción de la cadena respiratoria disminuye pero se activan otros mecanismos capaces de generar estrés oxidativo, como la isquemia-reperfusión, la cual es proporcional al esfuerzo realizado y que culmina con la re-oxigenación de las áreas isquémicas y la consiguiente producción de ROS (Adams y Best, 2002). En tal sentido, los resultados obtenidos en la presente tesis al comparar el consumo de O_2 con la frecuencia de células con daño parecen abonar la teoría de la generación de daño a partir de diferentes estímulos según sea ejercicio extremo o pos ejercicio ya que el pico de daño 30 minutos pos ejercicio se produce en presencia de bajos valores de consumo de O_2 . Es probable que tras el ejercicio adquieran más relevancia factores tales como mediadores inflamatorios, liberación de ROS por PMN y el fenómeno de isquemia-reperfusión. Este último probablemente también genere daño en el ADN por la vía de la producción de ROS, aunque el origen de estos últimos sea diferente. Es por ello que futuros estudios serán necesarios para dilucidar la

responsabilidad de cada uno de los factores generadores de daño durante el ejercicio en equinos bajo modelos de ejercicio como el planteado en el presente ensayo.

Finalmente, es importante destacar un último aspecto. Durante el desarrollo de los 2 experimentos, los animales utilizados para cada repetición fueron los mismos. Esto nos permitió especular que tras un período de 30 días la producción de daño en el ADN era totalmente subsanada, apoyándonos para dicha conclusión en la ausencia de diferencias estadísticas entre los valores basales obtenidos en cada caballo cuando era sometido repetidas veces a al mismo test de esfuerzo. También mencionamos el hecho de que la reducción en la intensidad y frecuencia de células con daño post esfuerzo máximo podría estar vinculada a la inmensa capacidad de reparación del ADN, característica que resulta indispensable para la vida y que es altamente efectiva especialmente en los primeros minutos posteriores a la ocurrencia del daño. Sin embargo, la existencia de reparación de la molécula de ADN no siempre es sinónimo de reparación adecuada. La tasa a la que la ADN Polimerasa agrega nucleótidos durante la replicación o reparación del ADN es considerado el principal factor determinante para la aparición de mutaciones espontáneas en los organismos eucariotas. No obstante, una batería de enzimas especialmente diseñadas se encargan de detectar y corregir los mencionados errores. Pese a ello, aun bajo un altísimo nivel de eficiencia, existe un remanente de errores no corregidos, que se fijan al ADN y que pueden desencadenar en el futuro el desarrollo de enfermedades o la reducción de la capacidad para enfrentar a las mismas. Una idea de la magnitud de dicho fenómeno puede apreciarse en humanos, en los que se ha estimado que los errores no corregidos bajo condiciones normales pueden abarcar un rango

que va desde 1×10^{-4} a 1×10^{-6} mutaciones por gameta (Clancy S, 2008). En equinos desconocemos la tasa de mutación espontánea y menos aún aquella derivada del incremento producido por reparación del ADN tras el ejercicio, pero sin duda, al tratarse de células del sistema inmune es factible asumir que la sucesión de reparaciones y la acumulación de errores de reparación pueden significar una debilidad inmunológica futura en aquellos animales sometidos crónicamente a esfuerzo físico de alta intensidad. Este aspecto, al igual que los mecanismos involucrados en la generación del daño merece sin duda futuros estudios.

5. CONCLUSIONES

- El ejercicio físico de alta intensidad en equinos produjo daño en la molécula de ADN de leucocitos de sangre periférica. Evidenciando que las consecuencias del esfuerzo extremo no solo afectan al tejido muscular sino que tienen además consecuencias sistémicas.
- A diferencia de los reportes habituales sobre este tópico, se demostró que dicho daño se produce básicamente durante el desarrollo del test de ejercicio y no posterior al mismo.
- El máximo nivel de daño en el ADN coincidió con el máximo consumo de oxígeno y con las concentraciones más altas de lactato en sangre.
- Se corroboró la presencia de una condición pro-oxidante en la sangre al establecer alteraciones en el patrón de ácidos grasos de membrana de eritrocitos, los cuales sufrieron una significativa reducción de ácidos grasos poli-insaturados, la inversión de la relación ácidos grasos saturados/insaturados, el aumento del índice de insaturación y el aumento de peroxidación de lípidos de membrana medidos por quimioluminiscencia.
- A partir de los resultados obtenidos en el experimento 2 fue posible establecer una conducta bifásica del daño en el ADN, con un pico en el momento de máximo esfuerzo y un segundo pico a los 30 minutos pos ejercicio. Dado que el primero coincidió con el máximo consumo de

oxígeno y con la condición pro-oxidante de la sangre es posible especular sobre el origen diferencial de dicho daño

- Las determinaciones de urea y CPK no fueron útiles para explicar el origen del daño en el ADN.
- Durante el desarrollo de los 2 experimentos, los animales utilizados para cada repetición fueron los mismos. Esto nos permitió establecer que tras un período razonable de tiempo el daño en el ADN producido durante el ejercicio fue totalmente subsanado.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams AK, Best TM. The role of antioxidants in exercise and disease prevention. *The Physician and Sports Medicine*, 30: 37-44. (2002)
2. Adelman, R.; Saul, R.L.; Ames, B.N. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2706-2708. (1988)
3. Ames, B.N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6858-6862. (1981)
4. Ames, B.N.; Gold, L.S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.* 250: 3-16. (1991)
5. Ames B N, Shigenaga MK, Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochem Biophys Acta*, 1271:165–170. (1995)
6. Armstrong R.B., Essén-Gustavsson B., Hoppeler H., et al. O₂ delivery at VO₂ max and oxidative capacity in muscles of standardbred horses. *J Appl Physiol*; 73:2274–2282. (1992)
7. Art T., Anderson L., Woakes A. J., et al. Mechanics of breathing during strenuous exercise in thoroughbred horses. *Resp Physiol* 1990; 82:279-294. (1990)
8. Art T., Lekeux P. Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. *Livestock Production Science* 92:101–111.(2005)

9. Ashton T., Rowlands C.C., Jones E., et al: Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 77:498-502. (1998)
10. Astrand. O. P. and Rodahl K. Desempeño físico. Procesos aeróbicos. (En): *Fisiología del trabajo físico*. 3ra Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp230 – 243. (1997)
11. Avellini L., Chiaradia E., Gaiti A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 123, 147-154.(1999)
12. Azizova O, Piryazev A, Nikitina N, et al. Effect of oxidized LDL on hemolytic resistance erythrocyte. *Bull Exp Biol Med*; 134: 137-138. (2002)
13. Balla J, Vercelloti G, Nath K, et al. Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant*; 18: 8-12. (2003)
14. Baserga, R. Introduction to the cell cycle, Chapter I. En: *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Stein, G.S.; Baserga, R.; Giordano, A.; Denhardt, D.T. (eds). Wiley-Liss, Inc. USA. (1998)
15. Beech J, Lindborg S., Fletcher, et al: Caffeine contractures twitch characteristics and the threshlod for Ca²⁺ - Induced Ca²⁺ release in skeletal muscle from horses with chronic intermittent rhabdomyolysis. *Res Vet Sci* 54:110, (1993)
16. Bender, M.A., Griggs, H.G., Bedford, J.S. Mechanism of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation. *Mutation Research*: 23: 197-212. (1974)
17. Benoni G, Bellavite P, Adami A, Chirumbolo S, Lippi G, Cuzzolin L B. Effect of acute exercise on some haematological parameters and neutrophil

- functions in active and inactive subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 70: 187 –191. (1995)
18. Betancourt M, Ortiz R, Gonzalez C, Perez P, Cortes L, Rodriguez L, Villasenor L. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electro-phoresis/comet assay. *Mutat. Res*, 331: 65-77. (1995)
 19. Boffi F.M. Metabolismos energéticos y ejercicio. En: *Fisiología del Ejercicio en Equinos*– 1ª ed. Autor: Boffi Federico Martín; Editorial: Inter-Médica, Argentina, ISBN 950-555-314-5. (2006)
 20. Boffi F. M. , Lindner A, López R. A., Botta V., Sadaba S., Muriel M. Effect of Recovery Periods during Conditioning of Horses on Fitness Parameters. *Journal of Equine Veterinary Science* 31: 661-666. (2011)
 21. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alphanatocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 300: 535–543. (1993)
 22. Bulter P. J.; Woakes A.J.; Smale K.; Roberts C.A.; Hillidge C.J.; Snow D.H. and Marlin D.J. Respiratory and cardiovascular adjustments during exercise of increasing intensity and during recovery in thoroughbred racehorses. *Exp Biol* 179: 159 – 180. (1993)
 23. Burdon RH. *Genes and the Environment*. Pennsylvania: Taylor and Francis Inc. (1999)
 24. Byrd S.K., McCutcheon L.J., Hodgson D.R, et al: Altered sarcoplasmic reticulum function after high intensity exercise. *J Appl Physiol* 67:2072. (1989)

25. Castejón F, Trigo P, Muñoz A, Riber C. Uric acid responses to endurance racing and relationships with performance, plasma biochemistry and metabolic alterations. *Equine Vet J Suppl. Aug; (36):70-3.* (2006)
26. Catalá A. Lipid peroxidation. *Principles of Free Radical Biomedicine. Volume 1.* Ed: K. Pantopoulos, H. M. Schipper. Nova Science Publishers, Inc. (2011)
27. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59:527-605. (1979)
28. Chevion S, Moran D, Heled Y, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci USA;* 100: 5119-5123. (2003)
29. Chiaradia, E., L. Avellini, F. Rueca, A. Spaterna, F. Porciello, M. T. Antonioni, and A. Gaiti. 1998. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in race horses. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol;* 119(4):833–6. (1998)
30. Christie W.W. *High-Performance Liquid Chromatography and Lipids.* Pergamon Books, Oxford. (1987)
31. Clancy, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education* 1(1):103. (2008)
32. Clark M.G. and Lardy H.A. Regulation of intermediary carbohydrate metabolism. *Intern. Rev. Sci. (Biochem).* 5: 223-266. (1975)
33. Clarkson P.M., Thompson, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. *American Journal of Clinical Nutrition* 72 (Suppl.2), 637S-646. (2000)
34. Collins A. R. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology.* Volume 26, Issue 3, pp 249-261. (2004)

35. Conley KE, Jones C. Myoglobin content and oxygen diffusion: model analysis of horse and steer muscle. *Am J Physiol*; 271:C2027–C2036. (1996)
36. Constantinopol M., Jones J.H., Weibel E.R., et al. Oxygen transport during exercise in large mammals. II. Oxygen uptake by the pulmonary gas exchanger. *J Appl Physiol*; 67:871–878. (1989)
37. Cooper C., Vollaard J., Choueiri T., et al. Exercise, free radical and oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 30: 280-285. (2002)
38. Cuttler, R.G. Antioxidants and aging. *J. Clin. Nutr.* 53, 373s-379s. (1991)
39. Davie A.J., Evans D.L., Hodgson D.R., et al. Effects of muscle glycogen depletion on some metabolic and physiological responses to submaximal treadmill exercise. *Can J Vet Res.* 1999; 63:241-247. (1999)
40. Davies, K. J.; Quintanilha, A. T.; Brooks, G. A.; Packer, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:1198–1205; (1982).
41. de Moffarts B., Kirschvink N., Art T., Pincemail, J., Lekeux, P.. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet J*; 169(1):65–74. (2005)
42. Deaton C.M.; Marlin D.J. Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract*, 2: 278–91. (2003)
43. Deaton, C.M., Marlin, D.J., Roberts, C.A., Smith, N., Harris P.A., Kelly, F.J., Schorter, R.C. Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. *Equine Veterinary Journal (Suppl. 34)*, 58-65. (2002)
44. Demirbag R, Yilmaz R, Guzel S, Celik H, Kocyigit A, Ozcan E. Effects of treadmill exercise test on oxidative/antioxidative parameters and DNA damage. *Anadolu Kardiyol Derg*, 6: 135-140. (2006)

45. Derman. K. D. and Noakes T. D. Comparative aspects of exercise physiology. Ed: Hodgson & Rose. (En): The athletic horses. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp 13 – 25. (1994)
46. Devasagayam TPA, Kamat J.P. Free radicals, antioxidants and human disease. EMSI Newsletter, 23:3-13. (2000)
47. Dillard C. J., Litov, R.E., Savin, W. M., Dumelin, E. E., Tappel, A. L.. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology* 45, 927-932. (1978)
48. Drogue, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Phys. Rev.* 82: 47-95.(2002)
49. Dulotu, F.N. Mutagénesis y Carcinogénesis ambiental. Capitulo 60, 693-704. En: Elementos de Política Ambiental. Editado por Goin, F y Goñi, R. Honorable Cámara de Diputados de la Provincia de Buenos Aires. (1993)
50. Dulout, F.N., C.A. Grillo, A.I. Seoane. Ensayos de Genética Toxicológica con base Citogenética. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, Centro de investigación en genética básica y aplicada (CIGEBA). (1996).
51. Dulout, F.N., De Luca, J.C., Seoane, A.I. Catedra de Genética y Biometría. Cuadernos de genética N° 4: Mutaciones y aberraciones cromosómicas. Universidad Nacional de La Plata. Fac. de Cs. Vet. Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada. (1997).
52. Dypbukt JM, Ankarcrona M, Burkitt M, Sjöholm A, Ström K, Orrenius S, Nicotera P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulinsecreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem.* 269: 30553-

30560. (1994)
53. Ebbeling C.B., Clarkson P.M. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med*, 7: 207-234. (1989)
 54. Ercal, N.; Gurer-Orhan, H.; Aykin-Burns, N. Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1: 529-539. (2001)
 55. Essén-Gustavsson, B., Gottlieb-Vedi, M., Lindholm, A. Muscle adenine nucleotide degradation during submaximal treadmill exercise to fatigue. *Equine Vet J* 30, 298-302. (1999)
 56. Essén-Gustavsson, B. Triglyceride storage in the skeletal muscle. In: *Nutrition of the exercising horse*, Saastamoinen, M.T., Martin-Rosset, W. (eds.), EAAP publication No. 125, Wageningen Academic publishers, 31- 42. (2008)
 57. Evans. D. L. The cardiovascular system: Anatomy physiology, and adaptations to exercise and training. Ed: Hodgson & Rose. (En): *The athletic horses*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp.129 – 144. (1994)
 58. Evans. D. L. and Rose R. J. Cardiovascular and respiratory responses to submaximal exercise training in the thoroughbred horse. *Pflugers Arch*. 411: 316 – 321. (1988)
 59. Fedde. M. R; Ho H. H.; and Wood S. C. Oxygen transport in exercising horses: importance of rheological properties of blood. En: J. EDUARDO; P.W. BICUDO. *The vertebrate gas transport cascade*. Ann, Mich. CRC Press. Arbor. pp 200 – 207. (1993)

60. Fenger. C. K; McKeever K. H.; Hinchcliff K. W. and Kohn C. W. Determinants of oxygen delivery and hemoglobin saturation during incremental exercise in horses. *AJVR*. Vol 61; N° 10: 1325 – 1332. (2000)
61. Ferrero. J. A, Fernández Vaquero A.. Consumo de oxígeno: concepto, bases fisiológicas y aplicaciones. Ed: J. L. CHICHARO; A. FERNANDEZ VAQUERO. (En): *Fisiología del ejercicio*. ed Panamericana. Madrid. pp 209 – 219. (1995)
62. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Med.*; 36: 327-58. (2006)
63. Flamino M. J. Exercise intolerante in endurance horses. *Vet. Clin. of North America: Equine Practice*. Vol. 12. N° 3. 495-515. Dicember (1996).
64. Folch J., Lees N. and Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509. (1957)
65. Friedberg, E.C.; Walker, G.C.; Siede, W. DNA damage. En: *DNA repair and mutagenesis*. Friedberg, E.C.; Walker, G.C.; Siede, W. (Eds.). ASM Press, Washinton, D.C. Cap. 1: 1-47. (1995)
66. Gäbel, G. Physiologische Grundlagen der körperlichen Belastung. *LBH: Proceedings, 5. Leipziger Tierärztekongress, Band 1*, 119-123.(2010)
67. Gandhi G. and Gunjan. Exercise-induced genetic damage: A review. *Int J Hum Genet*; 9(2):69-96. (2009)
68. Gerschman R. Oxigen poisoning and X-Irradiation. A mechanism in common. *Science* .119:623-6. (1954)
69. Gohil K, Viguie C, Stanley WC, et al: Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 64:115-119. (1988)

70. Gollnick P.D., Bertocci L.A., Kelso T.B., et al: The effect of high-intensity exercise on the respiratory capacity of skeletal muscle. *Pflugers Arch* 415:407, (1990)
71. Gomez-Cabrera M.C., Domenech E., Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology & Medicine*; 44:126-131. (2008a)
72. Gomez-Cabrera M.C., Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Viña J. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr.* Jan; 87(1):142-9. (2008b)
73. Gómez-Campos, R.; Cossio-Bolaños, M.A.; Brousett Minaya, M. y Hochmuller-Fogaca, R.T. Mecanismos implicados en la fatiga aguda. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte* vol. 10 (40): 537-555. (2010).
74. Gondim Fernando J. Treinamento de resistência e limiares metabólicos. http://www.endurancebrasil.com.br/port/tecnicas/limiares_metabolicos.php. Endurance Brasil Produzido por Breeder Editora e Comunicação, Rua Cristiano Viana, 965 05411-000 - São Paulo/SP.Brasil. (2006)
75. Gong, M. C.; Arbogast, S.; Guo, Z.; Mathenia, J.; Su, W.; Reid, M. B. Calcium independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J. Appl. Physiol.* 100: 399–405. (2006).
76. Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol.* 89(1):169-75. (2000)

77. Gunn HM. Muscle, bone and fat proportions and muscle distribution of thoroughbreds and quarter horses. In: Gillespie JR, Robinson NE, eds. *Equine exercise physiology 2*. Davis, CA: ICEEP; 1987:253–264.
78. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*. 15: 129-135. (1990)
79. Gutteridge J.M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*.41: 1819-1828. (1995)
80. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd ed.). Oxford, UK: Clarendon, 1989.
81. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 186: 1-85. (1990)
82. Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*.55: 44-49. (1997)
83. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed.Oxford: Oxford University Press. (1999)
84. Hargreaves B. J.; Kronfeld J.N.; Waldrom M.A.; Lopes I.S.; Gay K.E.; Saker W.L.; Cooper D.J.; Sklan y Harris P.A. Antioxidant status and muscle cell leakage during endurance exercise. *Equine Vet. J.*, 34: Suppl, 116-121. (2002).
85. Hartmann A., Plappert U., Raddatz K., Grunert-Fuchs M., Speit G. Does physical activity induce DNA damage?. *Mutagenesis*, 9: 269-272. (1994)
86. Hartmann A, Niess AM, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat Res*, 346(4): 195-202. (1995)

87. Hartmann A., Niess A.M. Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen C. K., Packer L., Hänninen O. (Eds.): *Exercise and Oxygen Toxicity: A Handbook*. Elsevier Science: B.V. North Holland/New York, pp.195-217.(1999)
88. Hartmann A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A. & Speit, G., et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18: 45–51. (2003)
89. Hatefi, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069. (1985)
90. Helbock H.J., Beckman KB, Ames BN. 8-Hydroxyguanosine as biomarker of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol*, 300:156-165. (1999)
91. Hellsten-Westing Y, Balsom PD, Normon B, Sjodin B. The effect of high intensity training on purine metabolism in man. *Acta Physiol Scand*, 149: 405-412.(1993)
92. Hellsten Y. Xanthine dehydrogenase and purine metabolism in man : with special reference to exercise. *Acta Physiol Scand*, 621: 1-73. (1994)
93. Hermansen L., Osnes J.B. Blood and muscle pH after maximal exercise in man. *J Appl Physiol.* 32(3):304-8. (1972).
94. Hinchcliff, K.W., Geor, R.J. The horse as an athlete: a physiological overview. In: *Equine Exercise Physiology*, Hinchcliff, K.W., Geor, R.J., Kaneps, A.J. (eds.), Saunders Elsevier, Philadelphia, 2-11. (2008)
95. Hodgson, D.R. Energy considerations during exercise. *Equine Practice* 1, 447-460. (1985)
96. Iglesias Bernardo F.; Catalá Angel. Rat, caprine, equine and bovine erythrocyte ghosts exposed to t-butyl hydroperoxide as a model to study lipid

- peroxidation using a chemiluminescence assay. *Research in Veterinary Science*.79: 19-27. (2005)
97. Imlay, J.A.; Linn, S. (1986). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1309.
98. Inayama T., Oka J, Kashiba M, et al. Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols. *Life Sci* ; 70: 2039-2046. (2000)
99. Inoue T., Mu Z, Sumikawa K, Adachi K, Okochi T. Effect of physical exercise on the content of 8- hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res*, 84: 720-725. (1993)
100. Insua María Fernanda. Radicales libres, estrés oxidativo y ejercicio. <http://www.efdeportes.com/> Revista Digital - Buenos Aires - Año 9 - N° 66 - Noviembre de (2003)
101. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 9: 515-540. (1990)
102. Ji L., Mitchell E.W. Effects of adriamycin on heart mitochondrial function in rested and exercised rats. *Biochem Pharmacol*, 47: 877–885.(1994)
103. Ji L. Exercise, Oxidative Stress, and antioxidants. *Am J Sports Med*.24:20-22. (1996).
104. Ji L. Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise (44453). *Society for Experimental Biology and Medicine* Vol 222, 283-292. (1999).
105. Joenje, H. Genetic toxicology of oxygen. *Mutat. Res*. 219: 193-208. (1989)
106. Jones JH, Longworth KE, Lindholm A, et al. Oxygen transport during exercise in large mammals. I. Adaptive variation in oxygen demand. *J Appl Physiol*; 67:862–870. (1989)

107. Kagan, V.; Serbinova, E.; Koynova, G.; Tyurin, V.; Stoytchev, T.; Quinn, P.; Packer, L. Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 117-126. (1990)
108. Kanter, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Int. J. Sport Nutr.* 4: 205-220. (1994)
109. Kanter M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proc Nutr Soc* 57:9-13. (1998)
110. Kasprzak, K. Oxidative DNA damage and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Rad. Biol.* 32: 958-967. (2002)
111. Kayar SR, Hoppeler H, Lindstedt SL, et al. Total muscle mitochondrial volume in relation to aerobic capacity of horses and steers. *Pflugers Archiv: Europ J Physiol*; 413:343–347. (1989)
112. Keyse, S.M.; Tyrrell, R.M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 99-103. (1989)
113. Kindig C.A., Mc Donough P., Erickson H., and Poole D. Effect of L- NAME on oxygen uptake kinetics during heavy-intensity exercise in the horse. *J Appl Physiol* 91:891-896. (2001)
114. Kinding C.A.; P. McDonough; H. H. Erickson and D. Poole. Effect of l –NAME on oxygen uptake kinetics during heavy-intensity exercise in the horse. *J. Appl Physiol.* 91: 891 – 896. (2001)
115. Kinnunen S, Hyypa S, Lehmuskero A, et al. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. *Eur J Appl Physiol.* 95(5–6):550–6. (2005)

116. Kirschvink, N., Smith, N., Fi-Evez, L., Bougnet, V., Art, T., Degand, G., Marlin, D., Roberts, C., Genicot, B., Lindsey, P., Lekeux, P. Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of trained and heaves-affected horses. *Equine Veterinary Journal (Suppl. 34)*, 563–571. (2002a)
117. Kirschvink, N., Art, T., de Moffarts, B., Smith, N., Marlin, D., Roberts, C., Lekeux, P. Relationship between markers of blood oxidant status and physiological variables in trained and heaves-affected horses after exercise. *Equine Veterinary Journal Suppl. 34*, 159–164. (2002b)
118. Kirschvink, N., Fi-Evez, L., Bougnet, V., Art, T., Degand, G., Smith, N., Marlin, D., Harris P., Lekeux, P. Effect of nutritional antioxidant supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. *Equine Veterinary Journal (Suppl. 34)*, 705–712. (2002c)
119. Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux B. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J* 2008 ;177:178–91. (2008)
120. Krebs H.A. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Prespect. Biol. Med.* 14: 154-170. (1970)
121. Kristal BS, Park BK, Yu BP. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 271: 6033-6038. (1996)
122. Kuo C, Fattor JA, Henderson GC, Brooks GA. Lipid oxidation in fit young adults during postexercise recovery. *J Appl Physiol* 2005; 99: 349-356. (2005)
123. Lawrence L.M. Nutrition and fuel utilization in the athletic horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 6:393, (1990)

124. Leeuwenburgh, C., Heinecke, J. W.. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current Medical Chemistry* 8, 829-838. (2001)
125. Lily L. Wua, Chiuan-Chian Chioud, Pi-Yueh Change , James T. Wua. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* 339:1 – 9.(2004)
126. Llanillo M., Sanchez-Yague J., Checa A Martin-Valmaseda., E.M., Felipe A. Phospholipid and fatty acid composition in stored sheep erythrocytes of different densities. *Exp. Hematol.*, 23, pp. 258–264. (1995)
127. Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J*, 8: 534-537. (1994)
128. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265–275. (1951)
129. Lykkesfeldt J., Loft S., Poulsen H.E. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection—Are they reliable biomarkers of oxidative stress? *Anal Biochem* 229:329-335. (1995)
130. Malech, H. L.; Gallin, J. I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N. Engl. J. Med.* 317:687–694. (1987)
131. Marlin D.J.M., Fenn K., Smith N., Deaton C.D., Roberts C. A., Harris P. A., Dunster C. and Kelly F. J. . Changes in Circulatory Antioxidant Status in Horses during Prolonged Exercise. *Waltham International Symposium: Pet Nutrition Coming of Age. American Society for Nutritional Sciences. J. Nutr.*132:1622S-1627S, (2002)

132. Marlin D.J.M. and Nankervis K. Respiratory system. Equine exercise physiology. Black Well: London. Pp. 42 – 55. (2003)
133. Marlin D.J.M., Johnson, L., Kingston, D.A., Smith, N.C., Deaton, C.M., Mann, S., Heaton, P., Van Vugt, F., Saunders, K., Kydd, J. and Harris, P.A. Application of Comet Assay for Investigation of Oxidative DNA Damage in Equine Peripheral Blood Mononuclear Cells. Waltham International Science Symposium: Nature, Nurture, and the Case for Nutrition. American Society for Nutritional Sciences. J Nutr 134, 2133S-2140S. (2004)
134. Marlin D.J.M. The Physiology of Fatigue in Horses During Exercise. Personal communication. Copyright David Marlin. All rights reserved. (2007)
135. Marotte, C. y Zeni, S.N. Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas. Acta bioquím. clín. latinoam. [online]. 2013, vol.47, (4), pp. 661-674.(2013)
136. Martin-Rosset, W. Energy requirements and allowances of exercising horses. In: Nutrition of the exercising horse, Saastamoinen, M.T., Martin- Rosset, W. (eds.), EAAP publication No. 125, Wageningen Academic publishers, 103-138. (2008)
137. Marx, J. L. Oxygen free radicals linked to many diseases. Science 235: 529-531. (1985)
138. Mastaloudis A., Yu T. W., O'Donnell R. P., Frei B., Dashwood R. H., Traber M. G. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med*, 36: 966-975. (2004)
139. McArdle, A.; Dillmann, W. H.; Mestril, R.; Faulkner, J. A.; Jackson, M. J. Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J*. 18:355–357. (2004)

140. McConaghy F. Thermoregulation. In Hodgson D.H., Rose R.J. (eds): *The Athletic Horse*. Philadelphia, WB Saunders. p 181. (1994)
141. McKeever KH, Hinchcliff KW, Reed SM, et al. Role of decreased plasma volume in hematocrit alterations during incremental treadmill exercise in horses. *Am J Physiol*; 25:233–236.(1993)
142. McKeever KH, Hinchcliff KW, Reed SM, Hamlin RL. Splenectomy alters blood-pressure response to incremental treadmill exercise in horses. *Am J Physiol*; 265:R409–R413. (1993)
143. Mills, P. C., N. C. Smith, I. Casas, P. Harris, R. C. Harris, and D. J. Marlin. Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *Eur. J. Appl. Physiol.* 74:60–66. (1996)
144. Mills, P.C., Higgins, A.J. Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: Implications for the exercising horse. *The Veterinary Journal* 153, 125–148. (1997)
145. Mills, P.C., Smith,N.C., Harris, R.C., Harris, P. Effects of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horses. *Research in Veterinary Science* 62, 11-16. (1997)
146. Mittal, C.K.; Murad, F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3', 5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4360-4364. (1977)
147. Moller P, Loft S, Lundby G, et al. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB J*; 15: 1181-1186. (2001)

148. Moody, C.J. and Hassan, H.M. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 79: 2855-2859. (1982)
149. Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K. Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol.* 14(4):1321-40. (1999)
150. Muriel M.; Cittar J.; Babucci M.; Britos R.; Zapata G.; Verna M.; Desmarás E. Variaciones del hematocrito durante el ejercicio en caballos normales y con alteraciones en el aparato respiratorio. III Workshop de Produção e Reprodução de Equinos. Universidade Federal de Pelotas, Hospital de Clínicas Veterinaria e Departamento de Clínicas. Pelotas, Brasil. (2000).
151. Muriel M.G. Trastornos Hidroelectrolíticos. Cap.18 Patologías que afectan al rendimiento deportivo. En: *Fisiología del Ejercicio en Equinos* 1ª ed. Ed: Boffi F.M.; Editorial: Inter-Médica, Argentina, 2006. ISBN 950-555-314-5. Pag. 282-289. (2006)
152. Muriel M. Deshidratación y agotamiento asociados al ejercicio de resistencia (síndrome del caballo exhausto). Conferencia Internacional de Caballos de Deporte CICADE 2014. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 26 al 29 de marzo de 2014. ISBN: 978-3-00-045091-4. pp: 32-41. (2014)
153. Natarajan A.T. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mut. Res.* 504: 3-16. (2002).
154. Nethery D.; Stofan D.; Callahan L.; DiMarco A.; Supinski G. Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA(2) dependent. *J. Appl. Physiol.* 87:792–800. (1999).

155. Nethery D.; Callahan, L. A.; Stofan, D.; Mattera, R.; DiMarco, A.; Supinski, G. PLA (2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Appl. Physiol.* 89:72–80. (2000)
156. Neubauer O, Reichhold S, Nersesyan A, König D, Wagner KH. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses?. *Exerc Immunol Rev.*14:51-72. (2008).
157. Nikolaidis M. G.; Jamurtas A. Z. Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Arch. Biochem. Biophys.* 490:77–84. (2009).
158. Niess, A. M., Hartmann A., Grunert-Fuchs M., Poch B., and Speit G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med.* 17:397-403. (1996)
159. Niess A. M., Baumann M., Roecker K., Hartmann T., Mayer F., and Dickhuth H.H. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leukocytes. *J Sports Med Phys Fitness*, 38: 111-115. (1998)
160. Noguchi N. & Niki E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health* (Papavas, A. M., ed.). CRC Press LLC, London, UK. (1999)
161. Nybo L., Moller K., S. Volianitis, B. Nielsen, N.H. Secher. Effects of hyperthermia on cerebral blood flow and metabolism during prolonged exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 93(1): 58–64. (2002)
162. Oldham K.M.; Bowen, P.E. Oxidative stress in critical care: Is antioxidant supplementation beneficial?. *J. Am. Diet. Assoc.* 98: 1001-1008. (1998)

163. Oostenburg G, Mensink R, Hardemen M, et al. Exercise performance red blood cell deformability and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol* ; 83: 746-752. (1997)
164. Orme C. E., Harris R.C., Marlin D.J., et al. Metabolic adaptation to fat-supplementation diet by the thoroughbred horse. *Br J Nutr.* 78:443-458.(1997)
165. Outram A. K. The Earliest Horse Harnessing and Milking. *Science* 6 March 2009: Vol. 323 no. 5919 pp. 1332-1335 *DOI:* 10.1126/science.1168594. (2009)
166. Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci* 15:353-363. (1997)
167. Persson S. On blood volume and working capacity in horses. *Acta Vet Scand; Suppl;* 19:9– 189. (1967)
168. Persson S.; Ulberg, L.E. Blood volume in the relation to exercise tolerance in trotters. *J S Afr Vet Assoc* 45:239, (1974)
169. Picco S. J. Consecuencias genotóxicas y clastogénicas de la hipocuprosis bovina. Tesis Doctoral. Fac. Cs. Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. (2004).
170. Piercy R.J.; Rivero J.L.L. Aparato musculoesquelético: Alteraciones musculares en los equinos de deporte. En: *Medicina y cirugía en los equinos de deporte: ciencias básicas y clínicas de los equinos de deporte.* Hinchcliff K.W., Geor R.J., Kaneps A.J. (eds). Inter-Médica, Buenos Aires. 89-126. (2007)
171. Piergiacomi, V; Leaden, P; Gutiérrez, M; Arcemis, C; Muriel, M; Palacios, A. Modification of lipid composition of erythrocytes equines after intense exercise. Publicado en: *Biocell*, vol. 32 N° 1 pag.132 (ISSN 0327-9545) 2008.

Editor: Instituto de Histología y Embriología "Dr. Mario H. Burgos" (IHEM-CONICET) <http://www.cricyt.edu.ar/biocell/> .(2008)

172. Poole D.C. Current concepts of oxygen transport during exercise. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 1 (1); 5-22. (2003)
173. Porter N.A.; Caldwell S.E.; Mills K.A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*. 30: 277-290. (1995)
174. Pösö. A. R. Monocarboxylate Transporters and lactate metabolism in Equine Athletes: A Review. *Acta. Vet. Scand.* 43: 63 – 74. (2002)
175. Powers, S. K. & Lennon, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 1025-1033, (1999)
176. Powers, S. K.; Jackson, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88:1243–1276; (2008).
177. Radak Z.; Asano K.; Inoue M. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol* ; 79: 129-135. (1995)
178. Randerath, K.; Liehr, J.G.; Gladek, A.; Randerath, E. Age-related DNA modifications (I-compounds): modulation by physiological and pathological processes. *Mutat. Res.* 238: 245-253. (1990)
179. Räsänen L. A.; Myllymaki T.; Hyyppä S.; Maisi P., Poso A. R. Accumulation of allantoin and uric acid in plasma of exercising trotters. *Am J Vet Res.* 54(11):1923-8. (1993)
180. Reddy, V. P.; Zhu, X.; Perry, G.; Smith, M. A. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 16:763–774. (2009)

181. Remmen H.V., Hamilton ML, Richardson A. Oxidative damage to DNA and aging. *Exerc Sport Sci*, 31: 149-153. (2003)
182. Rivero, J.L.L, Piercy, R.J. Muscle physiology: responses to exercise and training. In: *Equine Exercise Physiology*, Hinchcliff, K.W., Geor, R.J., Kaneps, A.J. (eds.), Saunders Elsevier, Philadelphia, 30-80. (2008)
183. Robinson. N. E. Panorama de la función respiratoria: La Ventilación del Pulmón. Correlación clínica: Fibrosis pulmonar en el perro. Enfermedad crónica de las vías aéreas en el caballo. Ed: J. A. Cunningham. (En) *Fisiología Veterinaria*. Interamericana Mcgraw-Hill. Distrito Federal. pp. 587 – 599. (1992)
184. Rodríguez Perón José Miguel y col. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit*, 30(1):36-44. (2001)
185. Roth, S.; Dröge, W. Regulation of T cell activation and T cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell Immunol* 108: 417-424. (1987)
186. Rose J. R. Electrolytes: Clinical aplicaciones. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 6:281. (1990)
187. Rose R. J. and Evans D.L..Cardiovascular and respiratory function in the athletic horses. In *Equine Exercise Physiology 2*. (ed. J. R. Gillespie and N. E. Robinson.) Davis. CA: ICEEP. Publications. pp 1 -24. (1987)
188. Saltin B., Karlsson J: Muscule glycogen utilization during work of different intensities. In Perrow B, Saltin B (eds): *Advances in Experimental Medicine and Biology: Muscle Metabolism During Exercise*, vol 11. New York, Plenum, p 289. (1971)

189. Sahlin K, Ekberg K, Cizinsky S. Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man. *Acta Physiol Scand*, 142: 273-281. (1991)
190. Samuelsson B, Granström E, Green K, Hamberg M, Hammarström S. Prostaglandins. *Annu Rev Biochem.*44: 669-695. (1975)
191. Sax, K. An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics* 25, 41-68. (1940).
192. Sax, K. Types and frequencies chromosomal aberrations induced by X-rays. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 9, 93-101. (1941).
193. Schenkman KA, Marble D, Burns DH, et al. Myoglobin oxygen dissociation by multiwave length spectroscopy. *J Appl Physiol*; 82:86–92. (1997)
194. Schiffli, C, Ziers C, Zankl H. Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. *Mutat Res*, 389: 243-246. (1997)
195. Schlipf J.W., Dunlop C.L., Getzy D.W. et al. Lesions associated with cardiac catheterization and thermodilution cardiac output determination in horses. In: 5th International Congress of Veterinary Anesthesia. Guelph, Ontario, Canada. (1994).
196. Schreck, R.; Baeuerle, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- κ B transcription factor and HIV-1. *Trends Cell Biol* 1: 39-42. (1991)
197. Sen, C. K. Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79 (3): 675-686, (1995)
198. Sen, C., Marin E, Kretzschmar M, et al. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol*; 73: 1265-1272. (1992)

199. Sen, C. K. & Goldfarb, A. H. Antioxidants and physical exercise. In: Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise (Sen, C. K. & Parcker, L. & Hannien, O., eds.), pp. 297-322. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. (2000)
200. Sen, C. K., Packer, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. American Journal of Clinical Nutrition. 72 (Suppl.2), 653S-669S. (2000).
201. Sentürk Ü. K., Gündüz F., Kuru O., et al. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. J Appl Physiol. 91:1999-2004. (2001)
202. Sevilla CL, Mahle NH, Eliezer N, Uzieblo A, O'Hara SM, Nokubo M, Miller R, Rouzer CA, Marnett L. Development of monoclonal antibodies to the malondialdehyde-deoxyguanosine adduct, pyrimidopurinone. Chem Res Toxicol. 10: 172-180. (1997)
203. Shacter E, Beecham EJ, Covey JM, Kohn EW, Potter M. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells Carcinogenesis, 9: 2297- 2304.(1988)
204. Smith JA, Telford RD, Mason IB, Weidemann MJ. Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. Int J Sports Med, 11: 179-187. (1990)
205. Smith LL. Acute inflammation: The underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? Med Sci Sports Exerc, 23: 542-551. (1991)
206. Siciliano, M., Tomasello, D., Milani, A., Ricerca, B.M., Storti, S., Rossi, L. Reduced serum levels of immunoreactive erythropoietin in patients with cirrhosis and chronic anemia. Hepatology. Oct; 22 (4 Pt1); 1132-5. (1995)

207. Simpson P, Lucchesi P. Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med.* 110: 13-30. (1987)
208. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184–191. (1988)
209. Spickett CM, Wiswedel I, Siems W, Zarkovic K, Zarkovic N. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radic Res.* 44:1172-1202. (2010)
210. Stringer W., Wasserman K., Casaburi R., Pórszász J., Maehara K., French W. Lactic acidosis as a facilitator of oxyhemoglobin dissociation during exercise. *J Appl Physiol.* 76(4):1462-7. (1994)
211. Strobel NA, Peake JM, Matsumoto A, Marsh SA, Coombes JS, Wadley GD. Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc.* 2011, Jun; 43(6):1017-24. (2011)
212. Suresh C, Tiwary RS. Free radicals in health and diseases. *Everyman's Science* 33: 149-153. (1999)
213. Suzuki K., Totsuka M., Nakaji S., Yamada M., Kudoh S., Liu Q., Sugawara K., Yamaya K., Sato K. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *Journal of Applied Physiology.* 87(4), 1360-1367. (1999)
214. Tamarin, R.H. *Principios de Genética.* Editorial Reverté, Barcelona. (1996)
215. Tice RR, Andrews PW, Singh NP. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular difference in DNA damage and repair. *Basic Life Sci,* 53: 291-301. (1990)

216. Trigo P. Fisiopatología del ejercicio en el caballo de resistencia. Tesis Doctoral. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba, España. ISBN.13:979-84-711—6935-9. (2010)
217. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease - a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*155: 117-30. (2011)
218. Umegaki K, Higuchi M, Inoue K, Esashi T. Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained and untrained men. *Int J Sports Med*, 19 : 581-585. (1998)
219. Valberg S.J. Muscular causes of exercise intolerance in horses. *Vet. Clin. of North America: Equine Practice*. Vol. 12. December, 1996. N° 3. 495-515. (1996)
220. Valberg S.J., Cardinet G.H. III, Lewis P.J., et al: Metabolic myopathies in the horse. *J Neurol Sci* 98:347. (1990)
221. Valberg S.J., Cardinet G.H. III: Diagnosis and differentiation of metabolic myopathies in the horse. In *Proceedings of the 10th American College of Veterinary Internal Medicine Forum*, San Diego, CA. (1992)
222. Valberg, S.J., Jonsson, L., Lindholm, A., Holmgren, N. Muscle Histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet J.* 25 (1), 11-6. (1993).
223. Valberg, S.J. Skeletal muscle function. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*, Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (eds.), Academic press, California, 459-484. (2008)

224. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* 12:1161-1208. (2005)
225. Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1–40; (2006).
226. Van Zeeland AA. DNA repair. En: *Mutations in man*. Obe, G. (ed.). Springer, Berlin, 1984: 35-57. (1984)
227. Vane JR, Botting RM. A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2). *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 23:41-48. (1995)
228. Vervuert Ingrid. Energy metabolism of the performance horse. Proceedings of the 5th European Equine Nutrition & Health Congress (EENHC), 2011 - Waregem, Belgium. Reprinted in IVIS with the permission of the Scientific Committee of the European Equine Health & Nutrition Congress: <http://www.equine-congress.com/>. 26-32. (2011)
229. Viña J., Gimeno A., Sastre J., Desco C., Asensi M., Pallardó F.V., Cuesta A., Ferrero J. A., Terada L. S. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB life.* 2000; 49 (6): 539-44. (2000)
230. Vladimirov Y.A, Olenev V.I., Suslova T.B., Cheremisina Z.P. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.*, 17, pp. 173–249. (1980)
231. Vollaard N, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: Myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.*; 35: 1045-62. (2006)

232. Wakil S.J., Stoops J.K., and Joshi V.C. Fatty acid synthesis and its regulations. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 537-579. (1983)
233. Weiss S. The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. *J Biol Chem*; 255: 9912-9917. (1980)
234. White A., Estrada M., Walker K., Wisnia P., Filgueira G., Valdes F., Araneda O., Behn C., and Martinez R. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in Thoroughbred race horses. *Comp. Biochem. Physiol. (A)* 128: 99-104. (2001)
235. Williams, C. A., et al. Lipoic acid as an antioxidant in thoroughbred geldings: a preliminary study. *J. Nutr.* 132: 1628-1632. (2001)
236. Williams, C. A., et al. Oxidative Stress in Horses in Three 80 km Races. *Equine Nutr. Phys. Soc. Proc.* 18:47-52. (2003a).
237. Williams, C. A., et al. Vitamin E intake and oxidative stress in endurance horses. *Equine Nutr. Phys. Soc. Proc.* 18:134-135. (2003b)
238. Williams, C. A., D. S. Kronfeld, T. M. Hess, K. E. Saker, and P. A. Harris. Lipoic acid and vitamin E supplementation to horses diminishes endurance exercise induced oxidative stress, muscle enzyme leakage, and apoptosis. Pages 105–119 in *The Elite Race and Endurance Horse*. A. Lindner, ed. CESMAS, Oslo, Norway. (2004a)
239. Williams, C. A., Kornfeldt, D.S., Hess, T.M., Saker, K.E., Waldron, J.N., Crandell, K.M., Hoffman, R.M., Harris, P.A. Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80 Km endurance race. *Journal of Animal Science* 82 (2), 588-594. (2004b)
240. Williams C.A., Kronfeld DS, Hess TM, Saker KE, Waldron DE, Crandell KM, Harris PA. Comparison of oxidative stress and antioxidant status in

- endurance horses in three 80 km races. *Equine Comp Ex Physiol*; 2:153–7. (2005).
241. Williams, C. A., Gordon M. E., Betros C. L., and McKeever K.H. Apoptosis and antioxidant status are influenced by age and exercise training in horses. *Journal of Animal Science* 2008, 86: 576-583.doi.102527/jas.2007-0585. (2008).
242. Williams C.A., Burk AO. Antioxidant status in elite three-day event horses during competition. *Oxid Med Cell Longev*; 2012:572–90. (2012)
243. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*, 313: 17- 29. (1996)
244. Wright J.R., Rumbaugh R.C., Colby H.D., Miles P.R. The relationship between chemiluminescence and lipid peroxidation in rat hepatic microsomes .*Arch. Biochem. Biophys.* 192, pp. 344–351. (1979)
245. Zerba E, Komorowski T, Faulkner JA. Free radical injury of skeletal muscles of young, adult, and old mice. *Am J Physiol*, 258: 429-435. (1990)
246. Zhao, X.; Bey, E. A.; Wientjes, F. B.; Cathcart, M. K. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) regulation of human monocyte NADPH oxidase activity: cPLA2 affects translocation but not phosphorylation of p67 (phox) and p47 (phox). *J. Biol. Chem.* 277:25385–25392. (2002)
247. Zuo, L.; Christofi, F. L.; Wright, V. P.; Bao, S.; Clanton, T. L. Lipoxygenase dependent superoxide release in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 97:661–668. (2004)