



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE
LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

COMPLEMENTACIÓN CON SELENIO Y VITAMINA E
EN EQUINOS SOMETIDOS A EJERCICIO FÍSICO MODERADO,
SU EFECTO EN ENZIMAS INDICADORAS DE DAÑO MUSCULAR Y DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

ELÍAS VELÁZQUEZ CANTÓN

TUTOR PRINCIPAL:

AURORA HILDA RAMÍREZ-PÉREZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FRANÇOIS MESCHY

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Papá, Mamá, Rafa, Paty y Marquito quienes siempre han estado a mi lado.

Agradezco como siempre el invaluable y desinteresado apoyo de la Dra. Aurora Hilda Ramírez Pérez, que como tutora principal siempre estuvo al frente de esta investigación, además agradezco el gran apoyo incondicional que siempre me ha brindado.

Al Dr. Luis Alberto Zarco Quintero, quien ha estado apoyándome como tutor de maestría y ahora en mis estudios doctorales.

Al gran apoyo del Dr. Eduardo Morones Soto, quien siempre nos ofreció todas las facilidades y amistad, así como al agrupamiento de la Policía Montada del gobierno de la CDMX, para finalizar con éxito esta investigación.

A la Dra. Silvia Elena Buntinx Dios, quien nos ha apoyado con consejos y participación proactiva en nuestros proyectos.

A todos los miembros de mi comité para la obtención de mi grado: Dra. Silvia Elena Buntinx Dios, Dra. Aurora Hilda Ramírez Pérez, Dr. Luis Alberto Zarco Quintero, Dra. Silvia Navarro y Dr. Octavio Castelán.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme apoyado con la beca durante mis estudios doctorales.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en especial al Departamento de Posgrado de la UNAM, por haber aceptado este proyecto de investigación doctoral.

A Diamond V, en especial al Dr. Fernando de la Colina y a DSM por el apoyo recibido.

El invaluable apoyo de mi amiga Liliana Berenice Ramírez Olivares, quien estuvo coadyuvando siempre de manera pro-activa en esta investigación.

A mi amigo Nazareth de la Cruz Rodríguez con quien compartí tema de investigación y logró obtener su título de Licenciatura.

A Reyna y Néstor por haber apoyado y participado de manera profesional en este proyecto.

A mi amigo Juan Carlos Ángeles Hernández por el apoyo brindado en los análisis estadísticos.

A la Dra. Ana Delia Rodríguez Cortéz del Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM quien nos apoyó con análisis de Laboratorio.

A la Química Delia Arlette Castillo Mata del Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM quien nos apoyó para la obtención de los análisis de laboratorio.

Al Químico Juan Carlos Ramírez Orejel y al Químico José Moisés Talamantes Gómez del Departamento de Toxicología de la FMVZ-UNAM por apoyarnos con los análisis de laboratorio.

CONTENIDO

Lista de Cuadros	4
Lista de Figuras.....	7
Abreviaturas.....	10
Resumen	13
1 Introducción.....	15
2 Revisión de la Literatura	17
2.1 Las Adaptaciones del Caballo para el Desempeño de Actividad Física	17
2.1.1 El Desarrollo de la Actividad Física	20
2.2 Estrés Oxidativo	38
2.2.1 Radicales libres	39
2.3 Actividad física y Estrés oxidativo.....	50
2.4 Antioxidantes.....	52
2.4.1 Antioxidantes enzimáticos	56
2.4.2 Antioxidantes no enzimáticos	59
2.4.3 Capacidad antioxidante	78
2.5 Justificación.....	81
2.6 Hipótesis.....	82
2.7 Objetivo.....	83
2.7.1 Objetivos específicos	83
3 Materiales y Métodos	84
3.1 Lugar	84
3.2 Animales, Alojamientos y Diseño experimental.....	84
3.3 Alimentos y Alimentación.....	86
3.4 Colección de Muestras sanguíneas y Ejercicio físico.....	87

3.5	Métodos de Análisis	88
3.5.1	Análisis de Laboratorio	88
3.5.3	Análisis Estadístico	92
4	Resultados y Discusión	93
4.1	Peso vivo	93
4.2	Cortisol y Malondialdehído.....	95
4.2.1	Cortisol: la Hormona con Funciones psicológicas, fisiológicas y físicas	95
4.2.2	Malondialdehído (MDA)	101
4.3	Selenio y Vitamina E.....	105
4.3.1	Dieta	105
4.3.2	Sangre y suero	107
4.4	Enzimas indicadoras de Daño muscular: Creatina Quinasa, CK; Aspartato Aminotransferasa, AST y Lactato Deshidrogenasa, LDH.....	121
4.5	Enzimas del Sistema antioxidante: Superóxido Dismutasa, SOD y Glutación Peroxidasa, gpx.....	131
4.6	Metales del Sistema antioxidante: Zinc y Cobre.....	147
4.6.1	Dieta	147
4.6.2	Sangre.....	148
4.7	Discusión General	157
5	Conclusiones	160
6	Implicaciones.....	163
7	Referencias	164

8 Anexos.....	199
I Lactato.....	199
Efecto de la Acumulación del Lactato en el Metabolismo muscular	199
Metabolismo del Lactato: Ejercicio y Recuperación.....	201
II Cuadros de Análisis Estadístico.....	203

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1	Características de desempeño entre especies atléticas y no atléticas.	18
Cuadro 2.2	Características de los tipos de fibras musculares en el caballo.	30
Cuadro 2.3	Distribución de las isoenzimas de la creatina quinasa (CK) en tejidos y órganos humanos.	32
Cuadro 2.4	Isoenzimas de lactato deshidrogenasa (LDH), monómeros que las conforman y tejidos u órganos donde están presentes.	37
Cuadro 2.5	Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.	41
Cuadro 2.6	Clasificación de los radicales libres de acuerdo con su origen.	42
Cuadro 2.7	Marcadores de estrés oxidativo.	48
Cuadro 2.8	Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.	54
Cuadro 2.9	Antioxidantes endógenos y exógenos de acuerdo a su peso molecular.	56
Cuadro 2.10	Selenoproteínas y su actividad.	60
Cuadro 3.1	Frecuencia cardiaca en caballos.	88
Cuadro 3.2	Ingredientes de la dieta y valor nutrimental de la dieta utilizada para caballos policía (450 kg PV)	89
Cuadro 3.3	Productos utilizados para la cuantificación de la actividad enzimática en suero y sangre.	90
Cuadro 4.1	Concentraciones séricas de cortisol (ng/mL) y de malondialdehído (MDA; nmol/mL) en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con selenio (seleno-levadura) y vitamina E (DL- α -tocoferol).....	97
Cuadro 4.2	Concentraciones séricas de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol/mL) en suero de caballos	103
Cuadro 4.3	Concentraciones sanguíneas de selenio (ng/mL) y séricas de α -tocoferol (Vitamina E, μ g/mL) en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con selenio (seleno-levadura) y vitamina E (DL- α -tocoferol).....	108
Cuadro 4.4	Biopotencia de diferentes fuentes de vitamina E	117
Cuadro 4.5	Actividades séricas (U/L) de CK, creatina quinasa; AST, aspartato amino transferasa y LDH, lactato deshidrogenasa en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con selenio (seleno-levadura) y vitamina E (DL- α -tocoferol).....	122
Cuadro 4.6	Actividad sérica (U/L) de creatina quinasa, aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa en equinos sanos	126
Cuadro 4.7	Asociaciones entre las actividades séricas de creatina quinasa (CK) y aspartato amino transferasa (AST) en caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado	129

Cuadro 4.8 Asociaciones entre las actividades séricas de creatina quinasa (CK), aspartato amino transferasa (AST) y complementación con vitamina E en caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado	130
Cuadro 4.9 Asociaciones presentadas en el día 77 de experimentación entre las variables sanguíneas de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	131
Cuadro 4.10 Actividad eritrocitaria de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con selenio (seleno-levadura) y vitamina E (DL- α -tocoferol).....	132
Cuadro 4.11 Actividad sérica de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en equinos sanos.....	136
Cuadro 4.12 Asociaciones entre el tiempo (días, 21 al 42) y la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) eritrocitaria en caballos complementados con seleno-levadura y DL- α -tocoferol sometidos a ejercicio moderado	145
Cuadro 4.13 Asociaciones entre el tiempo (días, 43 al 77) y la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) eritrocitaria en caballos complementados con seleno-levadura y DL- α -tocoferol sometidos a ejercicio moderado	146
Cuadro 4.14 Actividad eritrocitaria de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con seleno-levadura (Se) y DL- α -tocoferol (E)	149
Cuadro 4.15 Asociaciones entre variables sanguíneas de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	155
Cuadro 8.1 Análisis estadístico para el peso vivo de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	203
Cuadro 8.2 Análisis estadístico para la concentración de cortisol en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	204
Cuadro 8.3 Análisis estadístico para la concentración de malondialdehído (MDA) en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	204

Cuadro 8.4	Análisis estadístico para la concentración sanguínea de selenio en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	205
Cuadro 8.5	Análisis estadístico para la concentración de alfa tocoferol en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	205
Cuadro 8.6	Análisis estadístico para la actividad enzimática de creatina quinasa (CK) en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.	206
Cuadro 8.7	Análisis estadístico para la actividad enzimática de aspartato amino transferasa (AST) en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.	206
Cuadro 8.8	Análisis estadístico para la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos de niveles DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.	207
Cuadro 8.9	Análisis estadístico para la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.	207
Cuadro 8.10	Análisis estadístico para la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) eritrocitaria en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.	208
Cuadro 8.11	Análisis estadístico para la concentración sanguínea de zinc en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	208
Cuadro 8.12	Análisis estadístico para la concentración sanguínea de cobre en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.....	209

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Posible mecanismo del aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno relacionada a un episodio de ejercicio intenso. VO ₂ = volumen de oxígeno.....	23
Figura 2.2 Formación del anión superóxido (radical libre) a partir de la oxidación del NADPH+H ⁺ por la pérdida de electrones hacia el oxígeno molecular.	40
Figura 2.3 Principales rutas de oxidación y sistemas antioxidantes en los seres vivos.	45
Figura 2.4 Etapas de la peroxidación lipídica.	46
Figura 2.5 Acción antioxidante del α-tocoferol para reparar un fosfolípido oxidado.....	53
Figura 2.6 Consumo/exposición, metabolismo, distribución y excreción del selenio en el organismo animal.	66
Figura 3.1 Distribución de los diferentes periodos en que se mostraron los días experimentales y su duración en días (P = periodo).	86
Figura 4.1 Peso vivo (kg) promedio de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura; 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL-α tocoferol; 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.	95
Figura 4.2 Concentraciones promedio de cortisol en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL-α tocoferol; 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.....	99
Figura 4.3 Concentraciones promedio de malondialdehído (MDA) en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL-α tocoferol; 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.....	102

- Figura 4.4 Concentraciones promedio de selenio en sangre de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media. 109
- Figura 4.5 Concentraciones promedio de vitamina E en suero de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media. 114
- Figura 4.6 Actividad de (A) CK, creatina quinasa; (B) AST, aspartato aminotransferasa y (C) LDH, lactato deshidrogenasa, en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media. 123
- Fig. 4.7 Promedio de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media. 134

- Figura 4.8 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) eritrocitaria en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, LSe, 0.1 y HSe, 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, LE, 1.6 y HE, 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media. (A) Actividad de la GPx durante todo el periodo experimental; (B) Actividad de la GPx durante el periodo de actividad física, hasta la suspensión de la doble complementación. 142
- Figura 4.9 Modelo de reacciones metabólicas en el eritrocito humano. 144
- Figura 4.10 Concentraciones de zinc en sangre de caballos complementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media. 150
- Figura 4.11 Concentraciones de cobre en sangre de caballos complementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media. 151

ABREVIATURAS

AAS	espectrometría de absorción atómica
ADN	ácido desoxirribonucleico
AGPi	ácido graso poliinsaturado
AMP	adenosin monofosfato
APSe	adenosin fosfoselenato
AST	aspartato aminotransferasa
α -TOC	α -tocoferol en suero sanguíneo
α -TOCO \cdot	radical tocoferoxilo
α -TTP	proteína citosólica transportadora del α -tocoferol
ATP	adenosin trifosfato
BUN	N ureico en sangre
CDMX	ciudad de México
CGT	γ -glutamyl-transferasa
CK	creatina quinasa
CO	monóxido de carbono
CO ₂	bióxido de carbono
COR	cortisol
Cu	cobre
CV	coeficiente de variación
d	día
E	fuentes dietarias de vitamina E, DL- α -tocoferol, α -tocoferil, all-rac- α -tocoferol
EEM	error estándar de la media
ERNs	especies reactivas del N ₂
EROs	especies reactivas del O ₂
FADH	dinucleótido de flavina adenin
FAS	fosfatasa alcalina
FC max	frecuencia cardiaca máxima
Fe	hierro

FRAP	habilidad del plasma para reducir el Fe férrico
GPx	glutación peroxidasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GTP	guanosin trifosfato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
HDL	lipoproteína de alta densidad
HO ₂	hidroperóxidos lipídicos
HOCl	ácido hipocloroso
HSeHE	alto Se y alta vitamina E
HSeLE	alto Se y baja vitamina E
L [•]	radical lipídico
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	lipoproteína de alta densidad
LOO [•]	lípidos peróxido.
lpm	latidos por minuto
LPO	peroxidación lipídica o lipoperoxidación
LSeHE	bajo SE y alta vitamina E
LSeLE	bajo Se y baja vitamina E
MCT	transportadores de monocarboxilato
MDA	malondialdehído
MPO	mieloperoxidasa
MS	materia seca
NAD	nicotin adenin dinucleótido oxidado
NADH+H ⁺	nicotin adenin dinucleótido reducido
NADPH	nicotin adenin dinucleótido fosforilado, reducido
NO ₂	dióxido de nitrógeno
NRC	National Research Council
O ₂	oxígeno

O ₂ ^{•-}	anión super óxido
O ₃	ozono
[•] OH	radical hidroxilo
ONOO [•]	peroxinitrito
ORAC	capacidad de absorbancia de los radicales del oxígeno
P1	periodo de adaptación
P2	periodo de ejercicio moderado
P3	periodo de descanso
P4	periodo de re-adaptación
PAPSe	fosfoadenosin fosfoselenato
PM ₁₀	material particulado, diámetro menor a 10 µm
PV	peso vivo
RL	radical libre
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
RO [•]	radical alcoxilo
ROO [•]	radical peroxilo
Se	selenio
SeAH	Selenio-adenosil homocisteína
SeAM	Selenio adenosil metionina
SO ₂	dióxido de azufre
SOD	superóxido dismutasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitrúrico
TEAC	Capacidad Equivalente Antioxidante Trolox
TRAP	potencial de atrapamiento total del radical peroxil
UPMM	Unidad de Policía Metropolitana Montada
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad
VO ₂	volumen de O ₂
VO _{2MÁX}	máxima capacidad aeróbica
Zn	zinc

RESUMEN

En caballos sometidos a ejercicio moderado se evaluó el efecto de la complementación con selenio (Se, Se-levadura) y vitamina E (E, DL- α -tocoferol) en las actividades enzimáticas de creatina quinasa, CK; aspartato aminotransferasa, AST; lactato deshidrogenasa, LDH; superóxido dismutasa, SOD; glutatión peroxidasa, GPx, y en las concentraciones de vitamina E (α -TOC), Se, zinc (Zn), cobre (Cu), cortisol (COR) y malondialdehído (MDA). Se asignaron 24 caballos (5–15 años, 450 kg PV), a cuatro tratamientos (n = 6) en arreglo factorial de 2 niveles de Se (L=0.1 mg/kg MS; H=0.3 mg/kg MS) \times 2 niveles de E (L=1.6 UI/kg PV; H=2 UI/kg PV), en un diseño con mediciones repetidas. La dieta base fue pobre en Se y vitamina E (<2 μ g; 14.4 UI/kg MS, respectivamente). Los periodos experimentales fueron: adaptación (P1, día 0-32); ejercicio moderado (P2, día 33-56), descanso (P3, día 57-63), re-adaptación (P4, día 64-77). El ejercicio moderado consistió en 5:20:5 min de calentamiento:semigalope:enfriamiento en 3 días consecutivos por 4 días sin actividad. La suplementación finalizó en el día 63. Los caballos se muestrearon semanalmente para cuantificar los analitos por: espectrofotometría (enzimas), espectrometría de absorción atómica (Zn, Cu, Se), cromatografía de líquidos (α -TOC), colorimetría (MDA) y ELISA (COR). Los datos se analizaron (PROC MIXED, SAS 9.1.3) con un modelo mixto para el diseño descrito. Los efectos fijos fueron: día, Se, E y sus interacciones y el caballo anidado en el tratamiento fue aleatorio. La significancia se fijó a $P < 0.05$ y las medias se compararon con la prueba de Tukey-Kramer. El día (d) afectó todas las variables ($P < 0.05$), lo que se atribuyó al ejercicio moderado; en tanto, E no tuvo efecto alguno ($P > 0.05$). Los caballos que recibieron 0.3 mg Se/kg MS mostraron mayores ($P < 0.05$) concentraciones de COR y Se, pero, menores ($P < 0.05$) de α -TOC. La interacción Se \times E \times d afectó ($P < 0.05$) la actividad de la GPx en P2. La complementación con 0.3 mg Se/kg MS afectó el metabolismo energético y la capacidad antioxidante, pero, la vitamina E no afectó las variables estudiadas.

PALABRAS CLAVE: selenio, vitamina E, caballos, ejercicio, daño muscular, enzimas antioxidantes

ABSTRACT

The objective was to study the effect of selenium (Se, Se-yeast) and vitamin E (E, DL- α -tocopherol) supplementation on enzymatic activities of creatine kinase, CK; aspartate aminotransferase, AST; lactate dehydrogenase, LDH; superoxide dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx; concentrations of vitamin E (α -TOC); Se; zinc, Zn; copper, Cu; cortisol, COR and malondialdehyde (MDA) in moderately exercised horses. Twenty-four horses (5-15 years old, 450 kg BW) were assigned to one of the four experimental treatments (n = 6) in a factorial arrangement of 2 Se levels (mg / kg DM, LSe = 0.1; HSe = 0.3) \times 2 E levels (IU / kg BW, LE = 1.6; HE = 2), with repeated measures. The basal diet was poor in Se and vitamin E (<2 μ g, 14.4 IU / kg DM, respectively). The study lasted 77 days distributed in 4 periods: adaptation (P1, day 0-32); moderate exercise (P2, day 33-56), rest (P3, day 57-63), re-adaptation (P4, day 64-77). The moderate exercise consisted of 05: 20: 05 min of walking: cantering: walking in 3 consecutive days alternated with 4 days of rest. The supplementation finished at day 63. Blood samples were weekly taken to quantify the enzymatic activity by spectrophotometry; Zn, Cu, Se by atomic absorption spectrometry; α -tocopherol by high performance of liquid chromatography; MDA by colorimetry and cortisol by ELISA. Data were analysed (PROC MIXED, SAS 9.1.3) with a mixed model for the described design. The fixed effects were day, Se, E and their interactions; the random effect was the horse nested within the treatment. The significance was set at P <0.05 and the means were compared with the Tukey-Kramer test. Day (d) affected all variables (P <0.05), which was attributed to moderate exercise; meanwhile, E had no effect (P >0.05). The horses that received 0.3 mg Se/kg DM showed higher (P < 0.05) concentrations of COR and Se, but, lower (P < 0.05) of α -TOC, than horses that received 0.1 mg Se/kg DM. The interaction Se \times E \times d affected (P < 0.05) the activity of the GPx in P2. Supplementation with 0.3 mg Se / kg DM affected energy metabolism and antioxidant capacity, but vitamin E did not affect (P > 0.05) any of the variables studied.

KEYWORDS: selenium, vitamin E, horses, exercise, muscle damage, antioxidant enzymes

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente, los caballos que realizan algún trabajo deportivo de alta exigencia física como el salto, carreras, endurance, así como los que desempeñan trabajos de carga, campo o de paseo, se someten a esfuerzos físicos exhaustivos, que pueden generar estrés fisiológico, patológico u oxidativo y comprometer su salud. Por ello, el equino debe generar mayor resistencia y recuperarse en menor tiempo. Si bien la exigencia es para todo el individuo, el tejido más comprometido es el músculo-esquelético, que modifica su metabolismo para responder a las demandas energéticas y realizar el trabajo físico. Pero, si la actividad es muy intensa y no hay entrenamiento previo, puede dañarse y perderse la homeostasis del sistema.

Como se mencionó, la actividad física intensa es una de las causas de estrés oxidativo que puede dañar a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos debido a la producción de radicales libres (Krumrych, 2010). Esto ocurre cuando se rebasan los mecanismos antioxidantes del organismo por la presencia de oxidantes o cuando hay una disminución de los antioxidantes (Kirschvink *et al.*, 2008). Éstos, pueden ser endógenos y exógenos, los cuales protegen del daño que ocasionan los oxidantes (también de origen endógeno y exógeno), ayudando, en primera instancia, a evitar cualquier impacto nocivo a nivel muscular y, en general, a todo el organismo. Los antioxidantes exógenos pueden proporcionarse en la dieta del caballo, el cual, de no recibir las cantidades que garanticen protección, puede desarrollar enfermedades crónico-degenerativas, resultado del estrés oxidativo, como: cáncer, enfermedades cardiovasculares, neuromusculares, pulmonares, artritis reumatoide, nefropatías, daños oculares severos, envejecimiento prematuro y la muerte (Pham-Huy *et al.*, 2008).

La actividad física intensa aumenta el consumo de oxígeno (O₂) y de la respiración mitocondrial en el músculo esquelético, generando radicales libres e incrementando la producción de peróxidos lipídicos (Ono *et al.*, 1990), que pueden provocar problemas musculares y moto-neuronales severos en individuos alimentados inadecuadamente. Pero, un consumo excesivo de antioxidantes también es nocivo porque puede generar toxicidad.

Afortunadamente, el organismo cuenta con su propio sistema de antioxidantes: las vitaminas A, E y C y los minerales traza selenio (Se), zinc (Zn), cobre (Cu) y Fe (hierro) contrarrestan a los radicales libres y disminuyen el efecto ocasionado por el estrés oxidativo.

2 REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Las ADAPTACIONES DEL CABALLO PARA EL DESEMPEÑO DE ACTIVIDAD FÍSICA

El caballo (*Eqqus ferus caballus*) evolucionó desarrollando diferentes características, que se han utilizado para la generación de las diferentes razas. Así, existen razas ligeras como:

- el Pura Sangre Inglés (PSI), puede alcanzar una velocidad de 64 km/h (18 m/s), logrando cubrir distancias entre 800 a 5000 m; por su velocidad, se utiliza como medio de transporte y para paseos y algunos deportes intensos, como competencia de salto, carreras de velocidad, etc.
- el Cuarto de Milla, alcanza una velocidad de 88 km/h y es la raza estándar para trote o caminata
- la raza Árabe, puede llegar a caminar hasta 160 km en un solo día en eventos de endurance, lo que demuestra su gran resistencia.

Por otra parte, existen razas pesadas, como la Draft, que puede pesar más de 1000 kg y recorrer distancias cortas en tiempos establecidos, y la Warmblood, que se caracteriza por su elegancia para la realización de rutinas de adiestramiento. Finalmente, están las razas pequeñas como los ponies (Hinchcliff *et al.*, 2008) y la Falabela.

Dadas las diferencias en raza, trabajo y estado fisiológico, algunas razas realizan mayor esfuerzo físico, lo que propicia el estrés oxidativo. El cuadro 2.1 presenta datos de algunas características de desempeño atlético, con el objetivo de apreciar las diferencias entre especies.

Los caballos, principalmente los de razas ligeras, están considerados como atletas y es el animal domesticado más veloz del planeta. Así como los atletas humanos, los caballos cuentan con habilidades únicas para incrementar su consumo de oxígeno durante el ejercicio intenso, gracias a una serie de adaptaciones fisiológicas en los órganos donde se

lleva a cabo el proceso de ventilación. Los caballos son respiradores nasales compulsivos; su hiperpnea requiere de varios cambios de presión, que podrían colapsar sus vías respiratorias. De esta forma, los caballos deportivos frecuentemente sufren de diversos problemas respiratorios que se relacionan con el estrés, tanto endógeno como exógeno, durante la carrera. Como desencadenantes del estrés endógeno pueden mencionarse la hipercalemia, lactacidemia, hipertermia y el estrés oxidativo, que pueden generar graves problemas pulmonares. Como factores exógenos se pueden indicar la pobre calidad del aire, la contaminación y agentes microbiológicos (Art y Lekeux, 2005).

Cuadro 2.1 Características de desempeño entre especies atléticas y no atléticas (*A partir de Hinchcliff et al., 2008*).

Especie	Peso (kg)	Velocidad km/h	Duración ejercicio	VO ₂ máx ^a (mL O ₂ /kg/min)	Frecuencia cardíaca ^b (lpm)
Caballos Pura Sangre Inglés	450	64 (máx)	2 min	180 - 200	240 (máx)
Caballos Endurance	400	15 - 35	6 - 8 h	180	
Humanos (Carrera olímpica de velocidad)	70	36 (máx)	9.4 s	85	220
Humanos (clase olímpica de endurance)	70	19	2 h	70	180
Galgo de carreras	34	64 (máx)	60 s	Sin reporte	300
Perros de trineo	25	20	10 días	170	300
Novillo	470			80	65
Cabra	32				90

^a Máxima capacidad aeróbica

^b Actividad atlética normal (latidos por minuto)

Los mecanismos del caballo para responder a la demanda de O₂ y energía son singulares; su máxima capacidad aeróbica (VO₂MÁX) es aproximadamente 2.6 veces mayor que la de un

bovino con talla y peso similares y 2 a 2.5 veces mayor que la de un atleta humano (Jones *et al.*, 1989). Sus adaptaciones anatómicas le permiten aumentar la cantidad de O₂ pulmonar y la capacidad de transportarlo y distribuirlo a los diferentes tejidos, sobre todo a la masa muscular, que constituye entre 0.40 y 0.55 del PV. El caballo es capaz de transportar grandes volúmenes de O₂, para hacer frente a la gran demanda metabólica generada por el ejercicio; su gran capacidad aeróbica se asocia a una frecuencia cardíaca máxima (FC max), que depende de la raza, sexo, edad, condición física y disciplina deportiva realizada (Vincent *et al.*, 2006) y a concentraciones altas de hemoglobina (11 a 19 g/dL).

La potencia cardíaca es el producto de la FC, la capacidad del corazón y la salida cardíaca, que determinan el flujo de sangre y, por consiguiente, de O₂. La salida cardíaca de un PSI en ejercicio intenso puede llegar hasta los 400 L/min. El máximo índice cardíaco no es diferente entre los caballos, bovinos o humanos; en los caballos, con un peso del corazón que oscila entre el 0.9 y el 1.1 % de su PV, la salida es proporcional a su volumen. El tamaño medio del corazón de los caballos depende de la raza; los de razas pesadas, como los Draft, tienen el corazón proporcionalmente más pequeño que los caballos de carreras (Hinchcliff *et al.*, 2008). En el periodo de ejercicio máximo en una caminadora, los PSI bombean 12 L de sangre por latido y ventilan 1600 L de aire/min. El espacio pleural y la capacidad pulmonar propician esta extraordinaria capacidad de flujo y la gran superficie alveolar del caballo (cuyos pulmones duplican la longitud de los pulmones de los bovinos y multiplican en 1.6 veces el área de intercambio gaseoso) facilita la difusión del O₂ desde la luz alveolar a los capilares sanguíneos a través de la membrana alveolo-capilar (Hinchcliff *et al.*, 2008). El O₂ es transportado por la circulación a todos los órganos, pero la cantidad de O₂ presente en la sangre es limitada; sin embargo, ésta se incrementa rápidamente por la contracción esplénica, que libera, además de células sanguíneas, plasma. Al incrementarse la concentración de hemoglobina debido a la deshidratación, aumenta también por arriba de 50 % la capacidad de obtener O₂ a través de la sangre arterial durante la fase del ejercicio. Finalmente, el O₂ llega al músculo estriado esquelético para utilizarse en la respiración celular; el cual, en el caballo tiene una gran densidad capilar, lo que contribuye a su

metabolismo aeróbico, además de poseer una gran cantidad de enzimas involucradas en la utilización muscular de energía. Por otra parte, su gran número de mitocondrias por unidad de peso (el músculo del caballo posee aproximadamente el doble de mitocondrias que el de un bovino similar en tamaño y talla) incrementa la capacidad oxidativa del músculo. Esta gran capacidad aeróbica muscular, aunada a la disponibilidad de sustrato y aporte de O_2 , permite que el caballo obtenga una máxima capacidad aeróbica (Hinchcliff *et al.*, 2008). Sin embargo, el primer blanco de ataque de las especies reactivas de O_2 (EROs) es la mitocondria, cuya exposición al riesgo aumenta en función de su actividad. Por ello, el caballo es un animal altamente expuesto al daño causado por las EROs ante la actividad aeróbica intensa.

2.1.1 EL DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD FÍSICA

Al inicio de la actividad física hay una respuesta coordinada de los sistemas para favorecer la actividad muscular; el equilibrio ácido-base y la temperatura se mantienen en los rangos de normalidad. Además, el flujo de los sustratos energéticos aumenta, lo que está en función de la duración e intensidad del ejercicio: cuando la duración se incrementa, aumenta la demanda de glucosa, la cual será satisfecha por el glucógeno muscular y la glucosa sanguínea (proveniente de la absorción intestinal o de la función hepática). Sin embargo, estas respuestas están bajo control hormonal, lo que involucra una disminución en la concentración de insulina y un aumento en las concentraciones de adrenalina, noradrenalina, cortisol y glucagón en la sangre. El resultado neto es un incremento en la entrega de glucosa al músculo esquelético, pero ésta provee menos del 10 % de la glucosa utilizada durante el ejercicio.

Para que la glucosa sea oxidada, se requiere de un flujo constante de O_2 , lo cual depende del óptimo funcionamiento de los sistemas respiratorio y cardiovascular. El aumento en el volumen de O_2 entregado al músculo se obtiene mediante (1) el incremento en la ventilación pulmonar y alveolar, (2) la capacidad de la sangre para transportarlo, reforzada

por (3) la contracción secundaria esplénica y (4) el trabajo cardiovascular (Hinchcliff *et al.*, 2008). Los mecanismos que controlan los VO_2 muscular y pulmonar durante la transición de ejercicio moderado a intenso residen en la habilidad de proveer los sustratos (O_2 , ADP, $\text{NADH}+\text{H}^+$) para el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Gurd *et al.*, 2006).

El bióxido de carbono (CO_2) y el lactato se producen durante el ejercicio por el metabolismo aeróbico y la glucólisis anaeróbica, respectivamente. El primero se genera en la mitocondria por el metabolismo aeróbico de carbohidratos y grasas y se transporta en grandes cantidades al torrente sanguíneo, lo que incrementa la presión parcial venosa de CO_2 y la concentración sanguínea de bicarbonato (HCO_3^-). Por otra parte, el metabolismo anaeróbico del piruvato genera lactato y un aumento en la concentración de H^+ . El transportador 3-monocarboxilato (MCT3) remueve el lactato del músculo hacia el torrente sanguíneo y tiene dos caminos: (1) metabolizarse a CO_2 y agua en los tejidos activos o (2) utilizarse para la síntesis de glucosa en el hígado, el riñón y las células musculares inactivas. Los H^+ producidos durante el metabolismo anaeróbico son neutralizados por amortiguadores intracelulares (como las proteínas) y extracelulares (como el HCO_3^-). Si bien los mecanismos anteriores ayudan a metabolizar o neutralizar el lactato, el ejercicio intenso produce una acidosis y acidemia arterial y venosa, una disminución en la concentración arterial de HCO_3^- y un marcado aumento en las concentraciones de CO_2 en la sangre venosa. Una acidosis asociada a un exceso de ejercicio es severa y sólo puede tolerarse por periodos cortos de tiempo. La resolución de la acidosis respiratoria ocurre segundos a minutos después de que cesa el ejercicio, aunque la acidosis metabólica se resuelve en un periodo de 30 a 60 min (Hinchcliff *et al.*, 2008).

La contracción muscular genera calor, lo que puede resultar en una hipertermia. En el caballo, el exceso de ejercicio es suficiente para elevar la temperatura de 3 a 5°C. Si el ejercicio es prolongado y no hay una disipación efectiva del calor (sudor, secreciones respiratorias y e irradiación a través de los movimientos de la piel y de las fosas nasales (Hinchcliff *et al.*, 2008), la temperatura rectal puede aumentar hasta los 42 °C, con el riesgo

de provocar un choque térmico en caballos (Hodgson *et al.*, 1993; Hodgson *et al.*, 1994; Mills *et al.*, 1996) y en humanos (Lindinger, 1999; Zhao *et al.*, 2013).

EL ENTRENAMIENTO

El entrenamiento, que consiste en una repetición constante de una actividad, tiene como objetivo mejorar la capacidad, productividad y desempeño del caballo y da como resultado una serie de cambios a nivel celular, tisular, de órganos y de sistemas. La adaptación al entrenamiento permite mayor consumo de O₂ durante y después del ejercicio. Sin embargo, incluso si el incremento en VO₂ es mínimo, éste es suficiente para estimular la generación de las EROs. Se ha sugerido que el aumento en la producción de RL y el subsecuente estrés oxidativo observado durante y después del ejercicio están mediados enzimáticamente (xantina oxidasa y NADPH oxidasa) por el metabolismo prostanoide, la respiración fagocítica y por la alteración en la homeostasis del Ca²⁺ (Bloomer y Goldfarb, 2004). La contracción muscular intensa produce cortos periodos de isquemia, seguidos de reperfusión; además, genera un estrés mecánico y/o daño muscular. Estos mecanismos podrían contribuir a incrementar la producción de EROs, así como la migración de células inflamatorias hacia el área afectada (Jackson, 2000; figura 2.1). Las enzimas pueden ser generadoras de RL ya que se activan ante los ciclos de isquemia–reperfusión, o también, la respuesta fagocítica que responde al daño muscular provocado por el ejercicio. Sin embargo, no están bien dilucidados los mecanismos que aumentan la formación de EROs observada durante el ejercicio anaeróbico (Bloomer y Goldfarb, 2004). Por otra parte, se sugiere que algunos metabolitos inducen un aumento en la transcripción del ADN para la síntesis de proteínas, incluyendo enzimas, mismas que controlan las funciones asociadas a esos metabolitos. Un aumento en la transcripción se encuentra asociado a un incremento en la traslación del RNAm y eventos postraslacionales, lo que resulta en una mayor producción de proteínas. El incremento en las enzimas permite un máximo procesamiento y eliminación de los metabolitos, tal como sucede con el ácido láctico durante la actividad anaeróbica del músculo (Pösö, 2002).

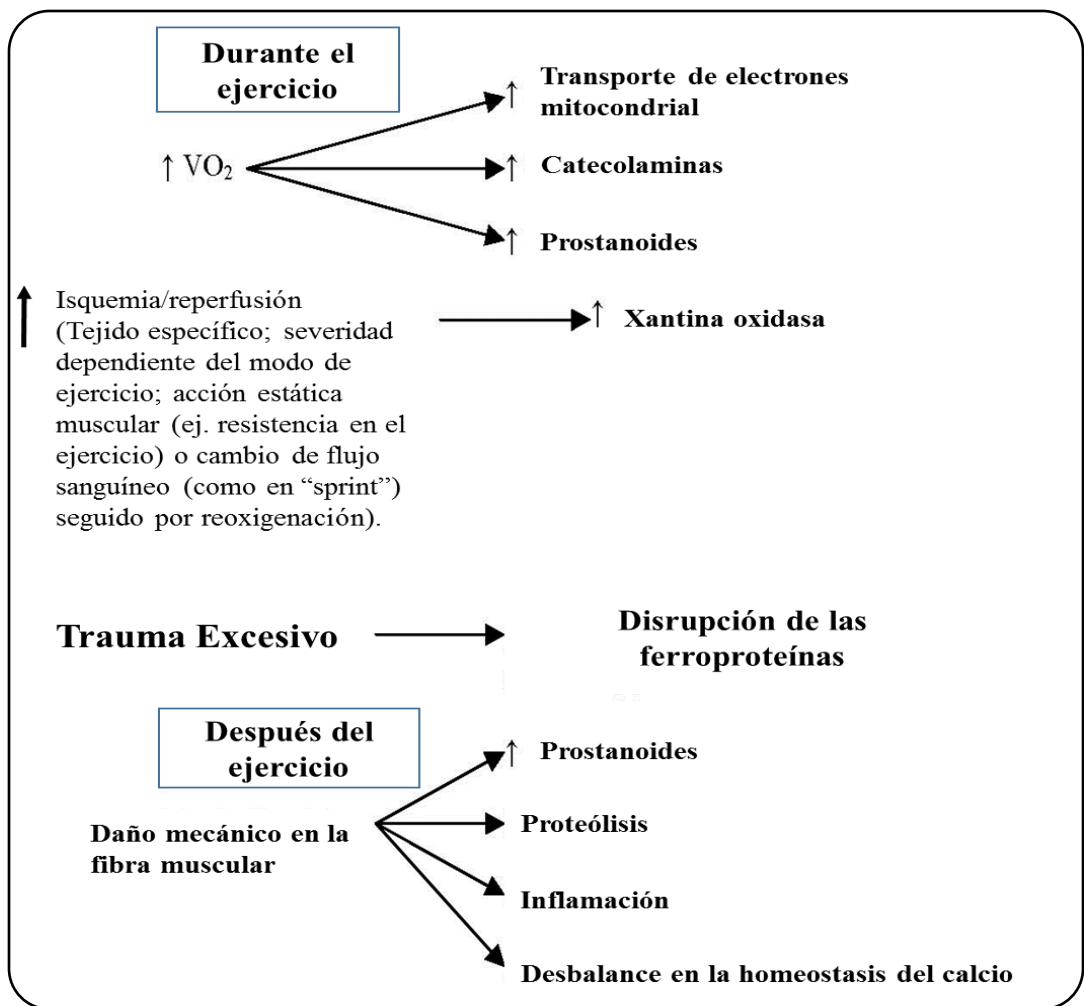


Figura 2.1 Posible mecanismo del aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno relacionada a un episodio de ejercicio intenso. VO₂ = volumen de oxígeno. (Tomado de Bloomer y Goldfarb, 2004).

EL SOBREENENTRENAMIENTO

El sobreentrenamiento consiste en forzar al atleta, obligándolo a incrementar la intensidad de su actividad deportiva, ocasionando una pérdida de la capacidad física y un desbalance neuroendócrino, con la presentación de síntomas físicos y emocionales similares a los de la depresión (De Graaf-Roelfsema *et al.*, 2010). Se considera un síndrome de fatiga crónica y pobre desempeño, acompañado por cambios fisiológicos y psicológicos (McGowan y Whitworth, 2008). En el caso de los caballos, el diagnóstico se complica por la

imposibilidad de realizar una evaluación psicológica. De esta forma, sólo se toma en cuenta la disminución en el desempeño y el consumo máximo de oxígeno (Hinchcliff *et al.*, 2008). Se puede observar pérdida de peso, irritabilidad, resistencia para realizar actividad física. Como el caballo es un animal muy nervioso, presenta taquicardia, temblores musculares, sudor y diarrea antes de la actividad, llegando incluso a mostrar inapetencia. La alimentación incorrecta puede contribuir a exacerbar el síndrome del sobreentrenamiento (Hinchcliff *et al.*, 2008). Sin embargo, los parámetros hemáticos y bioquímicos básicos pueden no alterarse, aunque sí se afectan las concentraciones de cortisol y las actividades de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST, antes TGO), lactato deshidrogenasa (LDH), creatina cinasa (CK) y γ -glutamyl-transferasa (CGT) (McGowan y Whitworth, 2008). Además, se afectan la fosfatasa alcalina (FAS), la bilirrubina total, el N ureico en sangre (BUN) y las globulinas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Padalino *et al.*, 2007).

De acuerdo con De Graaf-Roelfsema *et al.* (2010), el sobreentrenamiento no aumenta la incidencia de úlcera gástrica. Las hormonas reguladoras del metabolismo energético (insulina, glucagón, catecolaminas y cortisol) son esenciales para las reacciones fisiológicas y de adaptación durante el ejercicio y en la fase de recuperación modulan los procesos anabólicos y catabólicos. En los humanos, un sobreentrenamiento lleva a un desorden hipotálamo-pituitario, agotamiento adrenal con la reducción de las concentraciones de cortisol ya mencionadas, una baja regulación en los receptores β -adrenérgicos centrales y periféricos, así como una pérdida en la regulación neuromuscular (Hinchcliff *et al.*, 2008). La recuperación puede tardar desde semanas hasta meses (De Graaf-Roelfsema *et al.*, 2010).

CAMBIOS ORIGINADOS POR EL EJERCICIO

Si el entrenamiento es constante y el caballo está sano, su desempeño físico va mejorando progresivamente, incluso en caballos geriátricos. Por ejemplo, después de 10 semanas de entrenamiento, seis hembras Cuarto de Milla mayores de 23 años de edad mejoraron hasta en un 22 % su máxima capacidad aeróbica e incrementaron la actividad enzimática de la

citrato sintetasa y de la 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa en el tríceps. Bajo esta evidencia, Kim *et al.* (2005) concluyeron que los caballos de edad avanzada adaptan rápidamente sus capacidades aeróbica y oxidativa muscular e incrementan su resistencia al daño muscular ultra estructural inducido por el ejercicio. Williams *et al.* (2008) compararon las concentraciones plasmáticas de lactato de caballos mayores de 12 años de edad con las de mayores de 22 años después de haber sido entrenados 30 min/día, 3-5 veces/semana, durante 8 semanas: el lactato plasmático se elevó más en los caballos mayores de 12 años de edad que en los mayores de 22. Además, no encontraron correlación entre lipo-peroxidación, edad y el entrenamiento; por el contrario, el grupo de caballos mayores de 22 años de edad presentó apoptosis de células blancas. Así, diferentes estudios (Pedersen *et al.*, 1998; Moldoveanu *et al.*, 2001; Streltsova *et al.*, 2006; Liburt *et al.*, 2010) han demostrado que después de periodos de ejercicio, en los humanos, caballos y otras especies hay un aumento en la expresión de los niveles de RNAm para una gran variedad de citocinas, las cuales modulan el proceso inflamatorio. Se ha comprobado la relación existente entre el ejercicio físico, las citocinas y la endotoxemia (Barton *et al.*, 2003), tanto en el músculo como en la sangre (Liburt *et al.*, 2010).

Uno de los cambios que experimenta rápidamente el caballo después del cambio de ejercicio moderado a muy intenso, y que se utiliza para valorar su desempeño y capacidad anaeróbica, es el lactato. En caballos Pura Sangre Inglés después de aproximadamente 50 segundos de haber realizado un ejercicio máximo, 400 m en pista, la lactatemia cambió de 1.0 mmol/L a más de 14 mmol/L, valores similares a los encontrados después de una competencia de carreras. La importancia de las cuantificaciones del lactato sanguíneo estriba en que permiten diferenciar el desempeño físico, es decir, la respuesta anaeróbica. Otro indicador utilizado para medir el desempeño anaeróbico es el ácido úrico en la sangre (Hinchcliff *et al.*, 2008).

Entre los parámetros que permiten evaluar la capacidad del caballo para realizar ejercicio físico aeróbico y anaeróbico se encuentran la medición de la utilización del O₂ durante el

ejercicio y las concentraciones de lactato sanguíneo o sérico. Ambas variables permiten evaluar también el éxito de un programa de entrenamiento (Lindner, 2010).

MEDICIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE OXÍGENO DURANTE EL EJERCICIO

El ejercicio físico requiere de un dramático aumento en la utilización de oxígeno en todo el cuerpo, particularmente en el músculo esquelético, provocando el incremento en la actividad enzimática de la LDH y CK, pero si se elevan de manera importante en sangre, se asocian al daño muscular (Piccione *et al.*, 2007). El consumo de oxígeno (L de O₂/min) está en relación con la masa muscular y es fundamental cuantificarlo en cualquier tipo de ejercicio. En el caso de los humanos, la capacidad aeróbica se evalúa mediante el consumo de O₂ (VO₂) y de la máxima inspiración de oxígeno (VO_{2MAX})¹ (van Erck *et al.*, 2007). En su máximo potencial de ejercicio, los caballos, llegan a inhalar desde 30 hasta 40 L/s por fosa nasal, lo que excede los 1500 L de aire inspirado por minuto, de los cuales 120 L/min entrarán al intercambio gaseoso. Este consumo de O₂ durante un ejercicio máximo dependerá del paso y de la masa corporal, entre otros factores (Hinchcliff *et al.*, 2008).

El ejercicio agudo requiere incrementar el consumo de O₂, causando el movimiento de electrones desde la cadena de transferencia, lo que resulta en:

- 1) producción de O₂^{•-};
- 2) transformación de la xantina en ácido úrico por la xantina deshidrogenasa: la xantina se forma en el músculo durante el metabolismo anaeróbico del AMP; durante la reperfusión sanguínea del músculo esquelético aumenta la oxigenación y la hipoxantina se convierte en xantina y ésta en ácido úrico gracias a la xantina oxigenasa;
- 3) daño muscular causado por el ejercicio: se activan células inflamatorias (neutrófilos), con la subsecuente producción de RL vía la NADPH oxidasa;

¹ El cálculo del consumo de oxígeno requiere medir el flujo de aire durante la respiración, así como las concentraciones de CO₂ y O₂ en el gas inspirado que es espirado.

- 4) elevación en la concentración de catecolaminas, las cuales pueden sufrir auto-oxidación;
- 5) aumento en la formación de $O_2^{\cdot-}$ en las mitocondrias del músculo esquelético, con incremento de la temperatura; por lo tanto, la hipertermia desencadena el estrés oxidativo;
- 6) auto-oxidación de oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina, resultando en la producción de $O_2^{\cdot-}$ e incremento en el porcentaje de meta-hemoglobina (Belviranli y Gökbek, 2006).

La necesidad de que aumente el flujo de sangre al músculo durante el ejercicio requiere de un ritmo forzado del gasto cardiaco, lo que resulta en el aumento de la tasa cardiaca, de la contracción del miocardio y del trabajo ventricular, los principales determinantes de la demanda de O_2 por el miocardio. El tiempo de actividad física induce adaptaciones en la capilaridad coronaria, que incluyen un aumento en la densidad o en el diámetro arterial, lo que permite un incremento en el flujo sanguíneo coronario durante el ejercicio: más capilares son reclutados y, por ende, hay un aumento en la superficie capilar permeable. Asimismo, el entrenamiento también altera el control local de la irrigación coronaria (Duncker y Bache, 2008).

LACTATO

Dado que el papel del lactato en la fisiología muscular es importante y existen numerosas publicaciones al respecto, el tema sólo será brevemente revisado en este numeral. Para más detalles, véase el Anexo I.

El lactato es el producto final de la reducción del piruvato; su cuantificación se utiliza como un indicador de fatiga muscular durante el ejercicio (Muñoz *et al.*, 2002; Gramkow y Evans, 2006; Gondim *et al.*, 2007; Lindner, 2010; Lindner *et al.*, 2006). Investigaciones recientes (Leite *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2016) han profundizado en el conocimiento sobre su utilización metabólica como sustrato energético para el trabajo muscular y cerebral y no

sólo se ha dejado de considerar como un metabolito de desecho, sino que es un metabolito esencial para la reparación de los tejidos (Leite *et al.*, 2007). En el desarrollo del ejercicio moderado a intenso, aumenta la producción de LAC y su porcentaje de oxidación puede representar hasta el 25 % del total de la oxidación de carbohidratos en el organismo (Miller *et al.*, 2002). El LAC presenta dos isómeros, el D y el L. La forma L ha adquirido importancia como marcador en pacientes con problemas de isquemia intestinal (Tun-Abraham *et al.*, 2014) o de sepsis severa (Mikkelsen *et al.*, 2009); el D-lactato se produce de forma abundante por microorganismos.

Generación de Lactato muscular

Como ya se mencionó (véase numeral 2.1), el caballo tiene una gran capacidad oxidativa, representada por un consumo máximo de O₂ de alrededor de 160 mL/kg/min, lo que constituye más de dos veces la capacidad oxidativa del atleta humano. Sin embargo, diferentes factores, como la disponibilidad y la capacidad de utilización del O₂, la función cardiorrespiratoria, la concentración de hemoglobina, el tiempo del tránsito de la sangre en el músculo, la capilarización, la concentración de mioglobina muscular y el número de mitocondrias en las fibras musculares, pueden limitar el metabolismo muscular aeróbico. Además, cuando el músculo no está entrenado para responder a la actividad física intensa y la disponibilidad de O₂ se ve reducida, aumenta la producción de LAC, que puede acumularse en el miocito, acidificar el medio y contribuir a la fatiga muscular (Juel, 2008). Al pH fisiológico (7.4), el ácido láctico se encuentra mayormente dissociado (lactato) y utiliza transportadores de monocarboxilato (MCT) para atravesar el sarcolema hacia el plasma. Durante el ejercicio, el LAC deja el miocito utilizando los MCT, al tiempo que hay un flujo de protones; el transporte está controlado precisamente por los gradientes de estos protones no dependientes del ATP (Merezhinskaya y Fishbein, 2009). Los MCT transportan ácidos monocarboxílicos (piruvato, ácidos grasos de cadena corta y cuerpos cetónicos). El transporte es electroneutro, ya que el anión del monocarboxilato se transporta conjuntamente con su protón. El pH de la fibra muscular disminuye, pero está “regulado” por la capacidad amortiguadora de las proteínas musculares, por la respiración celular y por

el transporte del LAC y protones hacia fuera de las fibras musculares (Pösö y Puolanne, 2005). Cuando el ejercicio es moderado, la demanda de ATP puede satisfacerse con la fosforilación oxidativa, pero con el aumento en la intensidad del ejercicio, las vías anaeróbicas de producción de energía se vuelven más importantes (Brooks, 2002). Todas las fibras musculares contienen a la LDH; sin embargo, ésta presenta una mayor actividad en las fibras con menor número de mitocondrias y menor número de capilares por miocito (cuadro 2.2).

Lactato como Marcador de Desempeño

La producción del LAC muscular durante el ejercicio por la acción de la LDH, su transporte y eliminación se encuentran condicionados por lo siguiente:

- 1) La capacidad oxidativa de las fibras musculares: por ello, el entrenamiento resulta beneficioso, ya que favorece el incremento en el número de mitocondrias, lo que disminuirá la producción de LAC.
- 2) La concentración sanguínea de LAC está regulada por el flujo desde el músculo: en este caso, el entrenamiento aumenta el número de transportadores de proteínas de MCT en el sarcolema, lo cual facilita su desaparición del sarcoplasma.
- 3) La concentración de LAC sanguíneo está también regulada por el consumo de LAC como sustrato energético o gluconeogénico, lo que se incrementa por el entrenamiento.

Así, la concentración del LAC en la sangre funciona como un excelente marcador de la capacidad aeróbica y del éxito del trabajo de entrenamiento (Pösö, 2002). Para el entrenamiento de alto rendimiento se utilizan diferentes métodos que han originado distintos términos en referencia al LAC y al tipo de trabajo. Así, Heck *et al.* (1985) hablan del “umbral aneróbico” que se alcanza cuando la concentración sanguínea de LAC llega a los 4 mmol/L, misma que coincide con el “inicio de la acumulación de LAC sanguíneo”, frase propuesta por Sjödín y Jaccobs (1981). Faude *et al.* (2009) realizaron una revisión sobre la validez de los diferentes términos utilizados.

Cuadro 2.2 Características de los tipos de fibras musculares en el caballo
(Tomado de Marlin y Nankervis, 2013).

Características	Tipo de fibra		
	Roja, de resistencia	Blanca, de velocidad	
	I	IIA	IIB
Diámetro	+	++	+++
Contenido de mioglobina	+++	++	+
Capilares/ μm^2	2.6	2.3	1.5
Abundancia de mitocondrias	+++	++	+
Abundancia de retículo sarcoplásmico	+	++	+++
Actividad de las enzimas del ciclo de Krebs	+++	++	+
Contenido de lípidos	+++	++	+
Almacenamiento de glucógeno	+	++	+++
Capacidad oxidativa	+++	++	+
Producción de lactato	+	++	+++
Contenido de carnosina	+	++	+++
Tipo de ejercicio	aeróbico	anaeróbico	anaeróbico
Velocidad de contracción	Lenta	4x más que I	10x más que I 4x más que IIA
Velocidad del individuo	+	++	+++
Resistencia a la fatiga	+++	++	+
Fibras nerviosas por fibra			2000

INDICADORES DE DAÑO MUSCULAR

Si el caballo realiza actividad física sin entrenamiento previo o excediendo la intensidad a la que está habituado, los miocitos sufren daño, por lo que se desarrolla un proceso inflamatorio (Kinnunen *et al.*, 2005b). Pero, también puede presentarse la fatiga muscular aún sin daño celular (Gregory *et al.*, 2007). Este tipo de daño se caracteriza por una serie de alteraciones morfológicas, así como por la infiltración de neutrófilos debido a la activación de la cascada del complemento y de las proteínas C3a y C5a (Peake *et al.*, 2005) que son anafilotoxinas. Dado el daño muscular, existe una producción potencial de EROs tales como $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 y radicales $\cdot OH$; lo que provoca un daño oxidativo al DNA, lípidos y proteínas, afectando negativamente el desempeño físico (Deaton y Marlin, 2003). El daño muscular involucra la permeabilidad del sarcolema; por ello, aumenta la actividad enzimática en el suero de la CK, AST y LDH (Siciliano *et al.*, 1997; De Moffarts *et al.*, 2005; Williams y Carlucci, 2006; Teixeira-Neto *et al.*, 2008; Tadich *et al.*, 2013). La cuantificación de indicadores de la lipo-peroxidación en la misma matriz (Ono *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 2004; Kinnunen *et al.*, 2005b; Williams *et al.*, 2005; Al-Qudah y Al-Majali, 2006), como es el malondialdehído (MDA) (Chiaradia *et al.*, 1998; Onmaz *et al.*, 2011); además, la cuantificación del lactato (Matsuki *et al.*, 1991; Hoffman *et al.*, 2002; McGowan, 2008; Soares *et al.*, 2011; Zooba *et al.*, 2011; Williams y Burk., 2012), contribuyen a precisar la gravedad del daño muscular acontecido.

CREATINA QUINASA (CK)

La creatina quinasa (EC 2.7.3.2) es una enzima del grupo de las fosfotransferasas, con un grupo nitrogenado como aceptor. Está presente en vertebrados e invertebrados; fosforila a la creatina y participa en la activación de la energía (Soares *et al.*, 2013). Es un dímero formado por la combinación de 2 subunidades. Estas formas citosólicas o subunidades son: la B (“brain”, BB-CK) y la M (músculo, MM-CK). La combinación de ambas comprende la formación de 3 isoenzimas, distribuidas en los tejidos donde se produce o gasta ATP (cuadro 2.3): la isoenzima 1 (CK-1, BB) está formada por 2 subunidades B; la isoenzima 2 (CK-2, MB) está constituida por las unidades M y B y la isoenzima 3 (CK-3, MM) está

formada por 2 subunidades M. Existe una cuarta isoenzima localizada en el espacio intermembranal de la mitocondria (CK-Mi), que difiere de las anteriores en cuanto a movilidad electroforética y características antigénicas. Está formada por dos subunidades idénticas a las que coexisten en el músculo esquelético, la “sarcomérica (Mi_v-CK)” y la “ubicua (Mi_v-CK)”, las cuales tienen diferente punto isoeléctrico (Sánchez, 2000; McLeish y Kenyon, 2005).

La creatina quinasa se encuentra principalmente en el músculo-esquelético, en el músculo cardíaco y en el cerebro (cuadro 2.3). La CK-1 se encuentra en la mayoría de los tejidos, específicamente en las neuronas cerebrales; la CK-2 es la más específica de órgano, pues se encuentra principalmente en el músculo cardíaco y en concentraciones pequeñas, en el músculo esquelético, tanto en humanos como en animales. Finalmente, el 99 % de la CK del músculo esquelético y el 79 % de la CK del músculo cardíaco corresponde a la isoforma MM (Sánchez, 2000).

Cuadro 2.3 Distribución de las isoenzimas de la creatina quinasa (CK) en tejidos y órganos humanos (*A partir de Sánchez, 2000*).

Ítem	Concentración CK (µg/g)	Isoenzima 3 (MM, %)	Isoenzima 2 (MB, %)	Isoenzima 1 (BB, %)
Músculo Esquelético	2500	98.9	1.1	0.06
Cerebro	555	0	2.7	97.3
Músculo Cardíaco	473	78.7	20.0	1.3
Hígado	0.6	0	0	100

La CK genera ATP de forma continua a partir de la creatina fosfato en los tejidos en los que existe una demanda energética variable y/o elevada; evita la inactivación de las ATP-etas celulares causada por concentraciones elevadas de ADP; actúa como un transportador energético gracias a la compartimentación subcelular de sus isoenzimas, y contribuye a

evitar la acidificación de la célula como consecuencia de la hidrólisis de ATP. La CK proporciona la energía necesaria para la motilidad de los espermatozoides; también interviene en la fosforilación oxidativa, que tiene lugar en las mitocondrias de los músculos esquelético, cardíaco y del cerebro, transportando energía desde las mitocondrias al citoplasma celular (Sánchez, 2000) en forma de fosfato. La CK cataliza la transferencia reversible del fosfato a la creatina y al ADP. El sentido de la reacción depende del pH: a pH 9, la reacción está desplazada hacia la fosforilación de la creatina y a pH 6.7, hacia la formación de ATP. Como todas las quinasas, requiere de la presencia de magnesio ionizado (Mg^{2+}) para formar complejos con el ATP y ADP. Sin embargo, otros iones metálicos como el Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} pueden afectar la actividad enzimática (Sánchez, 2000). La Mi-CK, junto con las isoenzimas citosólicas de CK, provee una almacén temporal de energía para mantener la homeostasis energética de la célula (Schlattner *et al.*, 2006).

En los humanos, la actividad sérica total de la CK depende del sexo, edad, tipo de ejercicio o actividad física, masa muscular y condiciones climatológicas. Ocasionalmente se encuentran aumentos séricos persistentes en la actividad de la CK en individuos sanos, a quienes se les diagnostican enfermedades musculares en etapas pre-clínicas (Brancaccio *et al.*, 2007; Jović *et al.*, 2013).

En los caballos se han realizado estudios utilizando a la CK como indicador del daño al miocardio, como en los humanos (Holbrook *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2010; Nostell y Haggström, 2008; Durando *et al.*, 2006); sin embargo, es más sensible para el diagnóstico de enfermedades musculares, infarto al miocardio u otros eventos cardiovasculares. Generalmente, cualquier tipo de trauma en el músculo, tal como una contusión, cirugía, entrenamiento físico o alguna fractura, pueden aumentar la actividad de la CK, la cual puede mantenerse durante varias semanas o más con valores elevados (Hojati *et al.*, 2013). En el caballo, la CK se libera rápidamente del músculo hacia el torrente sanguíneo después de la actividad física, alcanzando el pico de actividad 4-12 horas post-ejercicio (Teixeira-Neto *et al.*, 2008) o hasta 24 h después (Brancaccio *et al.*, 2007); posteriormente, desciende gradualmente (Teixeira-Neto *et al.*, 2008). Es probable que el músculo se adapte al

ejercicio exhaustivo, lo que modifica la actividad de la CK (Piccione *et al.*, 2009; Adamu *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2011). Boffi *et al.* (2002) encontraron una tendencia ($P = 0.14$) para el efecto del entrenamiento en caminadora eléctrica en la actividad enzimática de la CK en el glúteo medio (116.3 ± 7.8 U/L vs 134.7 ± 19.3 en el grupo no entrenado). Aunado a este resultado, se observó la fragmentación del DNA y la apoptosis inducida en el músculo por el entrenamiento.

ASPARTATO TRANSAMINASA (ASPARTATO AMINOTRANSFERASA, AST)

Las transaminasas (Grupo 2.6.1) requieren de piridoxal fosfato (derivado de la vitamina B₆) como coenzima. Las transaminasas más comunes son la aspartato transaminasa (AST) (antes transaminasa glutámica oxaloacética, TGO) y la alanina aminotransferasa (ALT). Las transaminasas son clave en el metabolismo de los aminoácidos, utilizándose tanto en su síntesis como en su degradación.

La función de la AST (EC 2.6.1.1) es la desaminación del aspartato a oxaloacetato. Normalmente, su actividad es baja en el plasma; sin embargo, después del ejercicio o del daño muscular el escenario cambia: la actividad aumenta de forma importante en cuestión de minutos u horas, debido a la alteración en la permeabilidad de la membrana, por necrosis celular, eliminación deficiente o por un aumento en la síntesis enzimática (Soares *et al.*, 2013). Así, su liberación al torrente sanguíneo se lleva a cabo aproximadamente 24 h posteriores al estímulo estresante.

La AST se encuentra en varios tejidos de los mamíferos, en el citosol y la mitocondria del músculo esquelético, miocardio, cerebro, riñón, páncreas, pulmón, eritrocitos y linfocitos (Vargas Mendoza, 2012). Los niveles elevados de actividad de la AST son de utilidad diagnóstica para los daños hepático, cardíaco (Adeyemi *et al.*, 2015) y muscular. En el caso de los humanos, la cuantificación de las actividades de AST, ALT y γ -glutamyl transferasa (GGT) se utilizan como marcadores del hígado graso de origen no alcohólico (Schindhelm

et al., 2006); asimismo, la relación AST/ALT es de gran importancia clínica para determinar el grado de daño hepático (Giannini *et al.*, 2003), incluso por hepatitis C.

Si bien las actividades enzimáticas de CK, AST, LDH y ALT se incrementan en el suero después de un daño o necrosis muscular, la elevación de AST y ALT se asocia más al daño hepático, el cual puede ser secundario a la rhabdomiólisis (Nathwani *et al.*, 2005). Por ejemplo, Kedzierski *et al.* (2009) estudiaron caballos de carreras jóvenes (árabes y PSI), con cuatro meses previos de entrenamiento, y después de someterlos a una prueba estándar de ejercicio en campo (15 min de calentamiento, 3 series de 1200 m de galope a diferente velocidad: 7.50, 8.33 y 9.17 m/s, recorriendo 450, 500 y 550 m/min, respectivamente) no encontraron efecto del ejercicio en las actividades enzimáticas de CK, AST y LDH. Esta ausencia de efecto del ejercicio se ha observado también en pruebas de endurance (80 km a una velocidad entre 7 y 11.7 km/h) con caballos árabes (Kinnunen *et al.*, 2005b), donde CK y AST no mostraron diferencia estadística ($P > 0.05$) entre la cuantificación previa y posterior al ejercicio. Sin embargo, es necesario hacer notar que este trabajo contempló sólo 3 unidades experimentales.

El estrés generado por la transportación puede modificar también las actividades de estas enzimas. Medica *et al.* (2010) revisaron el efecto del transporte y del senderismo en las concentraciones sanguíneas de diferentes analitos en 2 grupos de caballos de diferentes razas. El primero fue transportado 70 km un día antes de la caminata y el segundo grupo se mantuvo sin mayor manejo en el sitio de experimentación. En el grupo 1, la actividad sérica de AST se vio afectada ($P < 0.05$) por la caminata del primer día, pero en el segundo día de caminata no hubo diferencia entre las actividades pre- y post-ejercicio; el segundo grupo no mostró diferencia ($P > 0.05$) entre ambas actividades. Cabe señalar que la transportación tampoco afectó ($P > 0.05$) la actividad de AST, lo que coincide con lo consignado por Onmaz *et al.* (2011) en caballos remolcados 538 km, durante 12 h. Por otra lado, se han señalado incrementos en la actividad de AST en caballos (Harris *et al.*, 1998; Valberg *et al.*, 1993), en humanos (Bruunsgard *et al.*, 1997) y en ratas (van der Meulen *et al.*, 1991) por efecto del ejercicio.

LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

El papel de la LDH (EC 1.1.99.6) en la reducción del piruvato es fundamental. La ruta inversa está regulada por las isoformas de LDH, formando un sistema metabólico altamente adaptable (Philp *et al.*, 2005). La energía para la contracción muscular se obtiene de la hidrólisis del ATP, el cual, a su vez, proviene del metabolismo de la fosfocreatina, glucosa, glucógeno, aminoácidos y ácidos grasos libres. La producción de ATP es mucho más eficiente cuando el aporte de O₂ es también suficiente para el miocito: la glucosa se oxida a piruvato, formando NADH+H⁺ durante el proceso, que utilizará la lanzadera de glicerol 3-P para regenerarse a NAD⁺ en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. El piruvato se descarboxilará a acetil-CoA, la cual se utilizará en el ciclo de Krebs para generar agentes reductores (NADH+H⁺ y FADH₂) y GTP para la producción de ATP en el mecanismo de fosforilación oxidativa. El metabolismo anaeróbico de la glucosa, aunque es menos eficiente, representa un importante y rápido mecanismo de generación de energía (Ferraz *et al.*, 2008). En condiciones de anaerobiosis, la LDH-5 convierte el piruvato a LAC (Koukourakis *et al.*, 2005), regenerando rápidamente al NAD⁺ para que la glucólisis siga llevándose a cabo (Andrzejewski y Chmura, 2008; Li *et al.*, 2012). Cuando la proporción NADH+H⁺/NAD aumenta, el piruvato es reducido a LAC y simultáneamente el NADH+H⁺ es oxidado a NAD (Pösö, 2002). Diversos factores regulan la vía glucolítica, tales como la disponibilidad del oxígeno, la actividad de la LDH y la relación dinámica ATP/ADP: una vez que esta relación comienza a disminuir, se estimula la glucólisis anaeróbica, aumentando la producción de piruvato y LAC (Ferraz *et al.*, 2008).

La LDH es abundante en el citosol del músculo cardiaco, del músculo esquelético y de otras células (Brooks *et al.*, 1999). Cuando la membrana celular se altera, la LDH escapa rápidamente al espacio extracelular, incrementando su actividad en el plasma (Jović *et al.*, 2013). Dependiendo de sus funciones, distintos tejidos presentan diferentes patrones en el comportamiento de esta enzima. El aumento de LDH depende del grado de daño que haya sufrido, por ejemplo, el miocardio (hipoxia, infarto y necrosis). La LDH es un tetrámero con dos tipos de monómeros: el A o M (por músculo) y el B o H (por el vocablo inglés para corazón, "heart"). Estos monómeros, al combinarse, constituyen 5 isoformas de la LDH. El

cuadro 2.4 presenta las 5 isoenzimas de LDH, los monómeros que contiene, así como el tejido donde es más abundante. Desde 1980 se reporta una sexta isoenzima de LDH (LDH₆), la cual está asociada a problemas circulatorios y hepáticos severos (Flynn y Bhagavan, 1986) y se ha encontrado en tejido hepático (Ketchum *et al.*, 1984).

Metabólicamente, cuando las isoenzimas de LDH poseen una mayor cantidad de cadenas A (LDH₅, LDHA), son más eficientes en catalizar la conversión de piruvato a lactato; contrariamente, un exceso de cadenas B (LDH₁, LDHB), favorece la conversión de piruvato a acetil-CoA para entrar al ciclo de Krebs. Un estudio inmunohistoquímico reveló que tejidos sanos y carcinomatosos contienen niveles similares de LDHB, pero que la LDHA se incrementa y es utilizada como biomarcador para determinar tejidos malignos, incluyendo linfoma, cáncer de próstata, carcinoma de células renales y melanoma. En células cancerosas de humanos aumenta la demanda de la glucólisis aeróbica; sin embargo, la hipoxia se encuentra presente en la mayor parte de su ambiente; consecuentemente, las células malignas modifican su metabolismo hacia una glucólisis anaeróbica para generar ATP (Miao *et al.*, 2013).

Cuadro 2.4 Isoenzimas de lactato deshidrogenasa (LDH), monómeros que las conforman y tejidos u órganos donde están presentes (*A partir de Torres et al., 2009*).

Isoenzima	Monómeros que contiene	Tejido u órgano donde es más abundante
LDH ₁	HHHH (4H)	Corazón y eritrocitos
LDH ₂	HHHM (3HM)	Sistema retículo-endotelial y leucocitos, la más abundante en LDH total
LDH ₃	HHMM (2H2M)	Pulmones
LDH ₄	HMMM (H3M)	Riñones, placenta y páncreas
LDH ₅	MMMM (4M)	Hígado y músculo esquelético

El aumento en la actividad sérica de LDH y de CK después de la realización de una actividad física exhaustiva, se debe al aumento selectivo en la permeabilidad de las membranas del músculo como resultado de la peroxidación lipídica. La medición en suero de la LDH total tiene un valor diagnóstico pobre debido a su distribución (cuadro 2.4), por lo que resulta de utilidad la cuantificación de las isoenzimas (Jović *et al.*, 2013). La actividad física de moderada a intensa incrementa las actividades séricas de LDH y CK en mayor grado que los ejercicios físicos ligeros (Hojati *et al.*, 2013). En respuesta a pruebas de velocidad (2400 m) o de endurance (40 km), Jović *et al.* (2013) observaron que únicamente la prueba de endurance afectó ($P < 0.05$) las actividades de la LDH total inmediatamente después de la actividad física y en el periodo de recuperación. Además, la prueba de endurance afectó la proporción de la actividad de las isoformas de LDH, principalmente LDH₂, LDH₄ y LDH₅. La mayor proporción estuvo constituida por LDH₃ (de 34.52 a 40.85 %).

2.2 ESTRÉS OXIDATIVO

Los individuos se encuentran expuestos constantemente a los efectos de los oxidantes exógenos y endógenos. Cuando una gran parte de estos iones o moléculas no pueden destruirse y se acumulan en el organismo, generando un balance antioxidantes/oxidantes a favor de estos últimos, se produce el estrés oxidativo. El sistema respiratorio es uno de lo que se expone mayormente a las fuentes exógenas por la presencia de los contaminantes criterio (O₃, ozono; NO₂, dióxido de nitrógeno; SO₂, dióxido de azufre; CO, monóxido de carbono; PM₁₀, material particulado <10 µm). Aunque los antioxidantes del tracto respiratorio son altamente efectivos, el estrés oxidativo pulmonar tiene un papel importante en el desarrollo de las enfermedades respiratorias (Rahman, 2005). Además de los contaminantes criterio, el humo del tabaco contribuye fuertemente a incrementar el estrés oxidativo, sobre todo en pacientes con enfermedad obstructiva pulmonar crónica (Bowler *et al.*, 2004). En los caballos, que son atletas clasificados como respiradores compulsivos, la exposición a los contaminantes criterio induce o acelera el estrés oxidativo pulmonar (Deaton *et al.*, 2005); sin embargo, se ha señalado que enfermedades como la neumonía y

la enteritis también están asociadas al estrés oxidativo (Lykkesfeldt y Svendsen., 2007). Los diferentes tipos de radiación son considerados causantes de estrés oxidativo; por ejemplo, la radiación X genera el radical hidroxilo y la radiación ultravioleta desestabiliza a los electrones con una subsecuente formación de radicales libres (Sies, 1997).

Los oxidantes endógenos se forman en diferentes puntos metabólicos de la célula. La mayor fuente es la cadena mitocondrial de transporte de electrones, donde 1–3 % del O₂ reducido a agua puede formar aniones superóxido (O₂^{•-}). Esta ruta es particularmente importante durante el ejercicio, cuando se incrementa el consumo de O₂ hasta 24 veces en el hombre y 40 veces en el caballo (Art y Lekeux, 1993). La segunda fuente fisiológica de oxidantes endógenos son las enzimas, como la xantina oxidasa, las oxidasas de membrana y la óxido nítrico sintetasa (Kirschvink *et al.*, 2008). La tercera fuente de oxidantes es la NADPH-oxidasa, que, durante el estallido respiratorio de las células inflamatorias, genera O₂^{•-}, que se incrementa en el proceso inflamatorio (Moslen, 1994). De esta forma, la inflamación aumenta la atracción de células inflamatorias, con la subsecuente liberación de oxidantes por parte de los neutrófilos y los macrófagos. Así, los oxidantes generados por los monocitos del sistema inmune neutralizan a los microorganismos a través de la peroxidación y desestabilización de sus membranas celulares, oxidación e inactivación de sus proteínas, que funcionan como receptores o enzimas, y la oxidación de su material nuclear (Kirschvink *et al.*, 2008). La producción de oxidantes puede aumentar en presencia de elementos pro-oxidantes, que transforman a los oxidantes en formas más reactivas. Por ejemplo, el hierro (Fe), que favorece la transformación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al radical hidroxilo (•OH), o la mieloperoxidasa (MPO), que también utiliza al H₂O₂ para formar ácido hipocloroso (HClO) (Roberfroid y Calderon, 1995).

2.2.1 RADICALES LIBRES

Los radicales libres son átomos, moléculas o fragmentos de ellas que contienen uno o más electrones impares dentro de su órbita atómica y/o molecular (Droge, 2002; figura 2.2.). Pueden ser de origen endógeno o exógeno. Los endógenos se generan por activación

inmune celular, inflamación, estimulación de neutrófilos por exposición a microbios, y por diversos orígenes, tales como: citocromo oxidasa mitocondrial, xantinas oxidasas, peroxidación lipídica, estrés mental, ejercicio excesivo, isquemia, infección, cáncer y envejecimiento. Los de origen exógeno pueden ser los contaminantes del aire o del agua, pesticidas, herbicidas, toxinas de hongos, xenobióticos, tabaco, alcohol, metales pesados (Cu, cobre; Cd, cadmio; Hg, mercurio; Pb, plomo; Fe, hierro, y As, arsénico), algunas drogas (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina, bleomicina), disolventes industriales, los que se producen por cocinar (humo que genera la carne, utilización de aceites y grasas) y las radiaciones (Frei, 1994; Valko *et al.*, 2007).

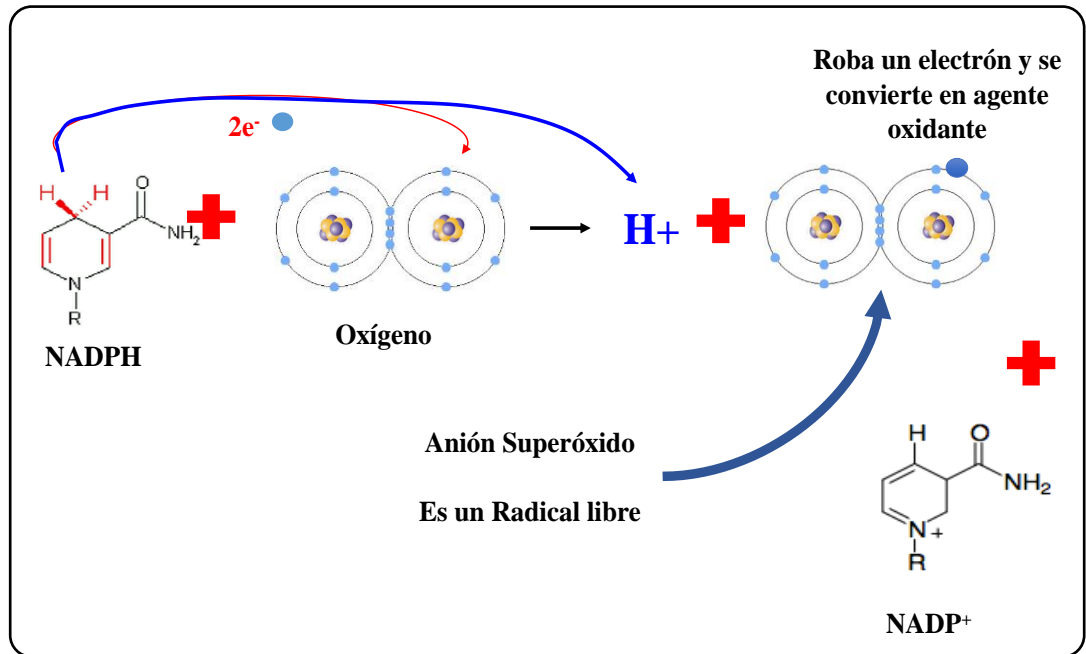


Figura 2.2 Formación del anión superóxido (radical libre) a partir de la oxidación del NADPH+H⁺ por la pérdida de electrones hacia el oxígeno molecular.

Los RL endógenos se forman en el organismo en un proceso metabólico normal (Sen *et al.*, 2010), ya sea vía ruptura del enlace, de tal forma que cada fragmento guarda un electrón, o por división del radical para brindar otro radical, o por reacciones de óxido-reducción (Bahorun *et al.*, 2006). Estas moléculas desencadenan estrés oxidativo, logrando alterar el

equilibrio entre los antioxidantes y los oxidantes, en favor de estos últimos (Sies, 1991). Los términos *especies reactivas del oxígeno* (EROs) y *del nitrógeno* (ERNs) se utilizan ampliamente para nombrar a los RL y otros derivados reactivos no-radicales, también llamados oxidantes. El cuadro 5 presenta las especies reactivas asociadas al metabolismo del O₂ y del nitrógeno (N₂), clasificadas estrictamente con base en si son o no RL; sin embargo, algunos de ellos, como el H₂O₂, no son RL, pero se comportan como tales en los organismos vivos (Genestra, 2007). El etano es otro RL producto de la oxidación de los lípidos de la membrana celular y se considera un marcador confiable del estrés oxidativo en humanos, perros y caballos (Wyse *et al.*, 2005).

Cuadro 2.5 Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (*A partir de Rigas y Sun, 2008*)

Especies reactivas del oxígeno		Especies reactivas del nitrógeno	
Radicales libres	No radicales	Radicales libres	No radicales
Superóxido (O ₂ ^{•-})	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Óxido nítrico (NO [•])	Ácido nitroso (HNO ₂)
Hidroxilo ([•] OH)	Oxígeno singlete (O ^{1/2})	Dióxido de nitrógeno (NO ₂ [•])	Peroxinitrito (ONOO [•])
Peroxil (ROO [•])	Ozono (O ₃)		Trióxido dinitrógeno (N ₂ O ₃)
Peroxil lipídico (LOO [•])	Ácido hipocloroso (HOCl)		
Peróxido lipídico (LOOH)			

Los RL juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, desórdenes autoinmunes, envejecimiento prematuro, cataratas, artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Pham-Huy *et al.*, 2008). En la membrana celular y, en general, donde hay ácidos grasos poliinsaturados, inducen el proceso de lipoperoxidación, alterando la composición lipídica de la membrana (Oostenbrug *et al.*, 1997) y provocando cambios en su permeabilidad y

fluidez (Wrobel y Gomulkiewicz, 1999). El cuadro 2.6 presenta la clasificación de los radicales libres según su origen.

Los RL son menos estables que las especies no radicales; por ello su reactividad generalmente es mayor. Los electrones no apareados están disponibles para reaccionar con las moléculas de lípidos, proteínas y ADN (Pham-Huy *et al.*, 2008). La vida media del $O_2^{\bullet-}$ es de 10^{-5} s y la del $\bullet OH$ es de 10^{-9} segundos (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009). El $O_2^{\bullet-}$ puede atravesar la membrana celular y dañar severamente a los tejidos, mientras que el radical $\bullet OH$ es un potente agente citotóxico, capaz de atacar y dañar cada molécula que encuentra en un tejido vivo. El H_2O_2 daña el ADN celular y causa la ruptura de la membrana, liberando el calcio ionizado (Ca^{2+}), lo que activa las enzimas proteolíticas. El HOCl es un potente activador de los neutrófilos y desactivador de las antiproteasas, lo que provoca daño celular (Sen *et al.*, 2010). Los RL producen oxidación de la cadena lateral de todos los residuos de proteínas, particularmente de cisteína y metionina (Stadtman, 2004).

Cuadro 2.6 Clasificación de los radicales libres de acuerdo con su origen (A partir de Vladimirov, 1998).

Tipo de radical	Origen	Especie
Radicales primarios	Sistemas enzimáticos	Superóxido
	Funciones biológicas	Semiquinonas Óxido nítrico
Radicales secundarios	Formados por hidroperóxidos en reacciones de Fe^{2+} y daño a la estructura celular	Radical hidroxil Radical peróxido lipídico
Radicales terciarios	Reacciones de los antioxidantes	Radicales de los antioxidantes

GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES

Como ya se mencionó, los RL se generan en los procesos metabólicos normales del individuo; los mamíferos obtienen energía a partir de la oxidación de carbohidratos, grasas

y proteínas, lo que da lugar a la generación de radicales libres (Sen *et al.*, 2010). Las EROs y las ERNs se forman en las células por reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las primeras incluyen a las enzimas que participan en la cadena respiratoria, la fagocitosis, la síntesis de prostaglandinas y el citocromo P₄₅₀ (Halliwell y Gutteridge, 2015; Halliwell, 2007). Por ejemplo, el O₂^{•-} es generado por las oxidasas celulares, tales como NADPH-oxidasa, xantina oxidasa, aminoácido oxidasa y peroxidasas; una vez formado, participa en la formación de H₂O₂, [•]OH, ONOO⁻ y HOCl. En relación con las reacciones no enzimáticas que producen RL, éstas involucran reacciones del O₂ con moléculas orgánicas, así como las que se inician por radiaciones ionizantes. Los procesos no enzimáticos pueden ocurrir durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Valko *et al.*, 2007).

ACCIONES BENÉFICAS DE LOS OXIDANTES Y RADICALES LIBRES

En concentraciones moderadas o bajas, tanto las EROs como las ERNs son necesarias para el proceso de maduración de la estructura celular y, de esta forma, actuar como un mecanismo de defensa para el huésped. Los fagocitos (neutrófilos, macrófagos y monocitos) liberan RL para destruir a microorganismos patógenos como parte del mecanismo de defensa (Young y Woodside, 2001). Los pacientes con enfermedad granulomatosa presentan un defecto en el sistema NADPH oxidasa de la membrana, que no produce el O₂^{•-}, lo cual resulta en infecciones constantes y múltiples (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Otro de los efectos benéficos de las EROs y ERNs es el envío de señales celulares (Halliwell, 2007; Pacher *et al.*, 2007), por ejemplo, para la atracción de células del sistema inmune. La producción de isoformas de la NADPH-oxidasa por parte de células no fagocitarias juega un papel importante en la regulación de las señales intracelulares de fibroblastos, células endoteliales, mesoteliales, miocitos cardiacos, hepatocitos y células de la tiroides. El óxido nítrico (NO) es un mensajero intracelular que regula el flujo sanguíneo y la actividad neuronal (Pacher, 2007); además, constituye un mecanismo de defensa

inespecífico, ya que combate patógenos intracelulares y células tumorales. Los RL también inducen la respuesta mitogénica, permitiendo la renovación celular (Genestra, 2007).

ACCIONES DAÑINAS DE LOS OXIDANTES Y RADICALES LIBRES

Cuando hay una producción excesiva de RL y un aumento en la presencia de agentes oxidantes, en desbalance con las moléculas antioxidantes, se produce, como ya se mencionó, el estrés oxidativo. Este es un proceso perjudicial para el individuo porque se dañan las proteínas, lípidos, lipoproteínas, ADN y las membranas celulares (Young y Woodside, 2001). Así, el exceso de $\cdot\text{OH}$ y $\text{ONOO}\cdot$ daña a la membrana celular y sus lipoproteínas, por la peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LPO). Esta reacción provoca la formación de malondialdehído (MDA) y sus componentes dienos conjugados, los cuales son mutagénicos y citotóxicos. La LPO ocurre por una reacción en cadena de RL (figura 2.3); una vez iniciada, se expande rápidamente y afecta a gran número de moléculas lipídicas (Frei, 1994). Las EROs y ERNs dañan la estructura de las proteínas y provocan la pérdida de la actividad de las enzimas (Halliwell, 2007). El daño oxidativo ocasionado al ADN puede desencadenar mutaciones; sin embargo, el organismo posee diversos mecanismos para contrarrestar los daños, utilizando enzimas reparadoras de ADN o sustancias antioxidantes (Willcox *et al.*, 2004).

Si el estrés oxidativo no se controla, puede inducir envejecimiento prematuro, enfermedades agudas y crónico-degenerativas (Pham-Huy *et al.*, 2008). Diversos trabajos han demostrado la producción de RL y la presencia de LPO en caballos sometidos a ejercicio (Hagget *et al.*, 2010; Krumrych, 2010; Wagner *et al.*, 2010; Calamari *et al.*; 2011; Soares *et al.*, 2011; Tadich *et al.*, 2013) o sin ejercicio (Knight y Tyznik, 1990; Richardson *et al.*, 2006; Onmaz *et al.* 2011; Niedzwiedz *et al.*, 2012), así como su papel en el desarrollo de enfermedades (Kirschvink *et al.*, 2002; Bolfă *et al.*, 2003; Divers *et al.*, 2006; Kienzle *et al.*, 2006; Mohammed *et al.*, 2007; El-Deeb y El-Bahr, 2010; El-Ashker, 2011; Ranjithkumar *et al.*, 2011; Van den Ende *et al.*, 2011; Youssef *et al.* 2012). Entre los desórdenes ocasionados por el desequilibrio oxidante/antioxidante se encuentra la

enfermedad del músculo blanco, que afecta principalmente a los potros, siendo la causa la deficiencia de antioxidantes (vitamina E y/o selenio) asociada a un programa de ejercicio exhaustivo. En el caso del ser humano, se ha probado que una adecuada capacidad antioxidante no aumenta la LPO (Schneider *et al.*, 2005).

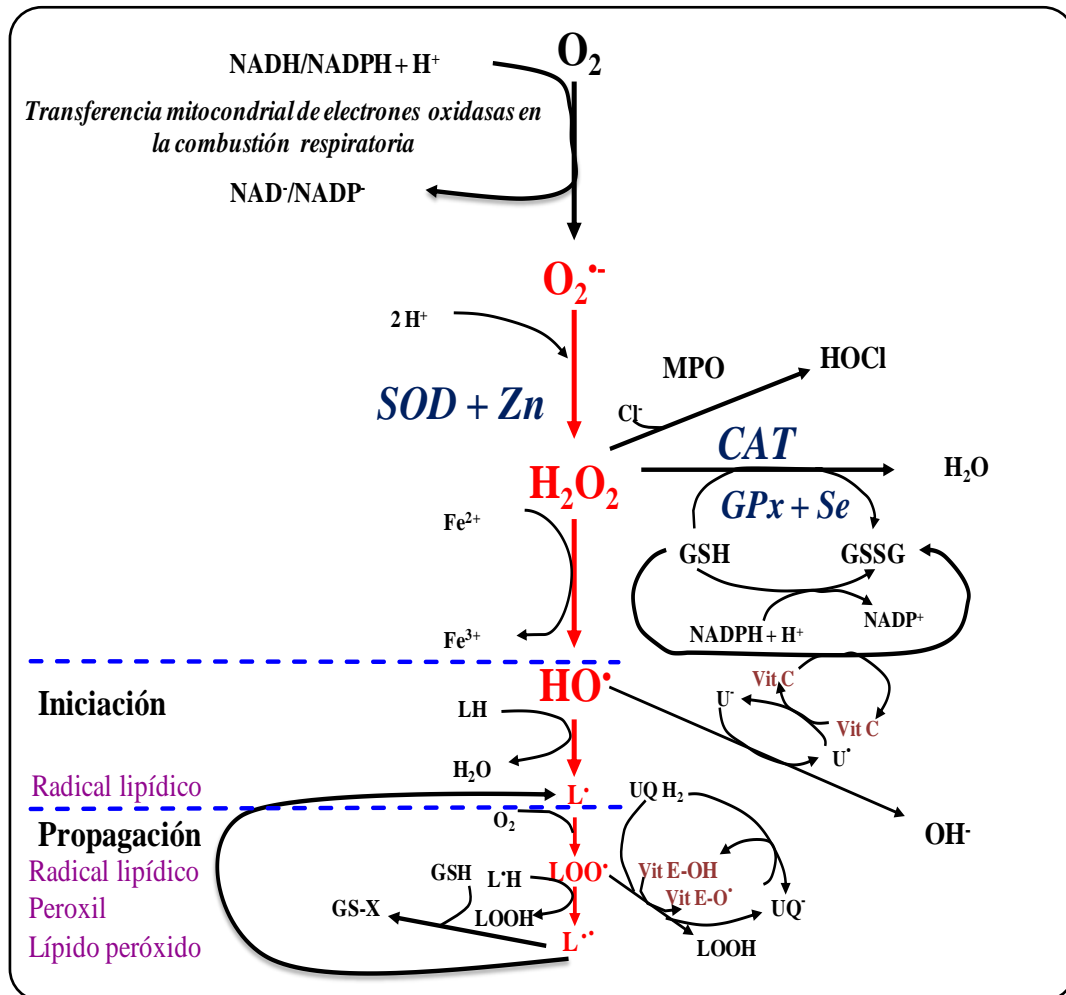


Figura 2.3 Principales rutas de oxidación y sistemas antioxidantes en los seres vivos. O_2 , oxígeno molecular; $O_2^{\cdot-}$, anión superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; $^{\cdot}OH$, radical hidroxilo; LH, ácidos grasos; L^{\cdot} , radical de ácido graso; LOO^{\cdot} , Lípido peróxido; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPx, Glutación peroxidasa; MPO, mieloperoxidasa; GSH, Glutación reducido; GSSG, Glutación oxidado; GS-X, Glutación ligada a un oxidante; NADPH, nicotinamida adenina fosfato; U, ácido úrico; Vit C, vitamina C; Vit E, vitamina E; UQ, ubiquinona (Modificado de Kirschvink *et al.*, 2008).

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Dentro de las biomoléculas más afectadas por el estrés oxidativo se encuentran los lípidos (Horton, 2003; Valko *et al.*, 2007; figura 2.4), cuyo proceso de peroxidación se lleva a cabo en 3 etapas: 1) iniciación, 2) propagación y 3) terminación (Catalá, 2006). Los lípidos de membrana, generalmente fosfolípidos, contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (AGPi), susceptibles a la peroxidación debido a la sustracción del átomo de H del grupo metileno (-CH₂-), el cual contiene un solo electrón, visto en una configuración tridimensional el electrón del carbono de la parte trasera es el que se libera.

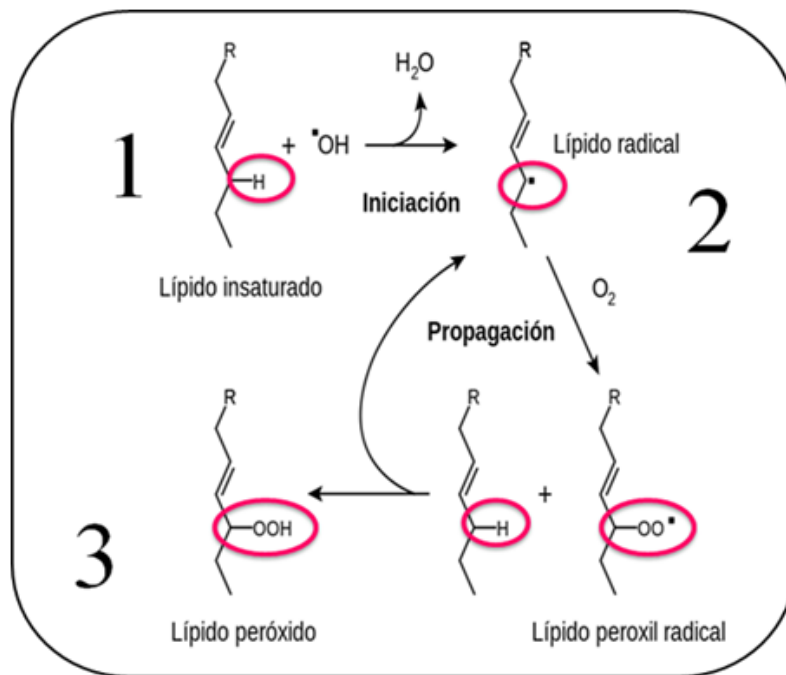


Figura 2.4 Etapas de la peroxidación lipídica (A partir de Urso y Clarkson, 2003).

La fase de iniciación incluye la sustracción del átomo de H, ya mencionada, misma que puede ser realizada por diferentes radicales como: hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), alcoxilo ($\text{RO}\cdot$), peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y, posiblemente, hidroperoxil ($\text{HO}_2\cdot$), pero no por H_2O_2 o por O_2 (Catalá, 2009). La reacción inicial del radical $\cdot\text{OH}$ con los AGPi produce un radical lipídico ($\text{L}\cdot$), que al reaccionar con el O_2 forma el radical peroxil lipídico ($\text{LOO}\cdot$) o lípido peróxido. Éste puede

sustraer hidrógeno del AGPi adyacente para producir hidroperóxido lipídico (LOOH^{*}), que es un segundo radical lipídico. Tanto el radical alcoxilo como el peroxilo estimulan la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, sustrayendo átomos de hidrógeno adicionales. Los productos de la peroxidación lipídica (radicales, hidroperóxidos lipídicos y derivados reactivos de aldehídos) dañan severamente a los tejidos y tienen la capacidad de alterar las estructuras proteínicas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Wataya *et al.*, 2002; Metz, 2003). Así, la peroxidación lipídica es un proceso degenerativo que altera la membrana celular, provocando cambios en su fluidez y permeabilidad y en el transporte de iones, que inhibe procesos metabólicos, tanto en animales (Nigam y Schewe, 2000) como en plantas (Xu *et al.*, 2006), que inactivan enzimas y que ocasiona efectos tóxicos durante la mitosis o meiosis (Catalá, 2009). Diferentes estudios (Baumber *et al.*, 2000; Oldenhof *et al.*, 2010) han demostrado que la LPO altera la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides en el semen del caballo. Además de estos daños, la LPO genera productos secundarios, como fragmentos de la cadena acil, lípido-lípido, lípido-proteína, y endociclización para producir isoprostanos y neuroprostanos.

En el músculo, uno de los principales cambios debidos a la oxidación se ha relacionado con la citotoxicidad de los fosfolípidos peroxidados de la membrana eritrocitaria, cuyos productos primarios son los hidroperóxidos lipídicos (HO₂), que alteran la homeostasis celular vía fosfolipasa A. El producto final de la peroxidación lipídica, principalmente los malondialdehídos, se encuentra asociado a la polimerización y agregación en los componentes de la membrana (Matsuki *et al.*, 1991).

MARCADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Generalmente, el estrés oxidativo puede “cuantificarse” mediante los productos moleculares que se generan en los procesos de formación de las EROs y ERNs. Comúnmente, estos productos incluyen metabolitos estables (nitratos y nitritos) o concentraciones de los productos de oxidación o peroxidación (cuadro 2.7).

Si el daño oxidativo se intensifica, pueden cuantificarse moléculas con cambios de óxido-reducción, como el glutatión. Las concentraciones de las vitaminas E y C y la actividad de enzimas antioxidantes como: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), son también indicadores de estrés oxidativo, que se incrementan cuando hay daño tisular (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009). En caballos, se han realizado diferentes estudios en los que se cuantifica la LPO cuando los animales realizan un tipo de actividad física, donde se demuestra el aumento de lipo-peroxidación (Matsuki *et al.*, 1991; Kinnunen *et al.*, 2005a; Williams *et al.*, 2005).

Cuadro 2.7 Marcadores de estrés oxidativo (A partir de Barbosa *et al.*, 2008; Dalle-Donne *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2014).

Marcador	Descripción
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	Resulta de la peroxidación lipídica, formando malondialdehído
Malondialdehído	Es la principal sustancia del grupo de las TBARS y el estándar utilizado en la cuantificación de las mismas
Dienos conjugados	Después de la formación de los peróxidos, los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados se reordenan para dar lugar a dienos conjugados (C=C-C=C-C)
Isoprostanos (8-epiPGF ₂)	Son derivados del ataque de los RL al ácido araquidónico (C20:4) de las membranas celulares; compuestos parecidos a las prostaglandinas.
Etano, pentano	Se forman como uno de los productos finales en la cadena de peroxidación de los lípidos que da lugar al radical alcoxilo (LO•), el cual es capaz de reiniciar la lipoperoxidación al quitar un H ⁺ a un ácido graso insaturado con la formación de L• y un alcohol LOH LOOH.
Lipoproteínas de baja densidad oxidadas	Los RL son capaces de dañar las lipoproteínas de baja densidad del transporte endógeno de lípidos
Carbonilos	En las proteínas aparecen grupos carbonilo (aldehído o cetona) por las reacciones oxidativas con los RL
Nitro-proteína (Nitrotirosina)	Los aminoácidos como la tirosina son afectados por acción de los especies reactivas de nitrógeno
8-oxo-2' deoxiguanosina (8OHdG)	Resulta del daño a la guanina
5-hidroximetil-2'-deoxiuridina (5HMdU)	Resulta del daño a la timina

En virtud de que el marcador de estrés de peroxidación lipídica cuantificado en el presente estudio fueron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, se presenta una revisión más minuciosa de las TBARS, con énfasis en el malondialdehído (MDA).

SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico son productos que resultan de la formación de RL en el proceso de peroxidación lipídica, que incluyen al malondialdehído (MDA), al etano y al pentano (Sachdev y Davies, 2008); por ello, se utilizan como biomarcadores del estrés oxidativo. En los humanos, se llegan a utilizar para determinar el nivel de ansiedad, así como el desorden obsesivo compulsivo (Chakraborty *et al.*, 2009); en becerros se utilizan como indicadores de la LPO durante el transporte (Wernicki *et al.*, 2006), mientras que en perros de cacería son indicadores de estrés oxidativo (Pasquini *et al.*, 2010).

Malondialdehído (MDA)

La peroxidación lipídica conduce a varios productos secundarios, siendo el MDA el de mayor generación. Esta molécula es altamente tóxica; su interacción con el ADN y las proteínas provoca mutagénesis y aterogénesis. Los productos finales de la LPO como el MDA, 4-hidroxinonal (HNE) y 4-hidroxihexenal (HHE) dañan a la proteína por reacciones con grupos lisina-NH₃, HS-cisteína y grupos imidazol-histidino (Catalá, 2009). Sin embargo, el MDA se considera como el gran marcador de la peroxidación lipídica (Del Río *et al.*, 2005; Seljeskog *et al.*, 2006). En humanos, se utiliza también para determinar la LPO causada por el humo del tabaco (Lykkesfeldt, 2007) y como indicador de los efectos de los contaminantes criterio en niños (Romieu *et al.*, 2008). En el caso de los caballos, se ha utilizado como un indicador para evaluar los efectos perjudiciales del transporte (Onmaz *et al.*, 2011) y los efectos durante el entrenamiento en una fase de ejercicio (Chiaradia *et al.*, 1998; Avellini *et al.*, 1999; Bergero *et al.*, 2004; Al-Qudah y Al-Majali, 2006; Duberstein *et al.*, 2009; Ducharme *et al.*, 2009; Gondim *et al.*, 2009; Jagrič-Munih *et al.*, 2012). Se han cuantificado, también, las concentraciones de MDA en los espermatozoides,

ya que su elevado metabolismo los hace altamente susceptibles a la LPO, provocando disminución en la fertilidad (Hsieh *et al.*, 2006; Ball, 2008).

2.3 ACTIVIDAD FÍSICA Y ESTRÉS OXIDATIVO

El ejercicio físico, principalmente el intenso, está muy relacionado con el aumento en la concentración de O₂ en el organismo, principalmente en el músculo esquelético. Gran parte del O₂ consumido es utilizado por la mitocondria para la producción de adenosín-5-trifosfato (ATP); además, puede inducir la oxidación (Sjödin *et al.*, 1990). Aunque la producción de energía también puede llevarse a cabo durante breves periodos de tiempo por el metabolismo anaeróbico, su producción total se encuentra asociada a la oxidación (Hinchcliff *et al.*, 2008). Así, existe la paradoja del O₂, ya que, por un lado, es vital para la vida, pero por otro lado, provoca graves daños celulares por eventos oxidativos (Sen *et al.*, 2010).

Entre 2 y 5 % del O₂ consumido es transformado a diversos intermediarios, como O²⁻, H₂O₂ y OH[•], que subsecuentemente permiten un intercambio en sus electrones. Como ya se ha indicado, todas estas moléculas se clasifican como EROs, son oxidantes y poseen un gran contenido de O₂ (Nogushi y Niki, 1999). Se caracterizan por contener uno o más electrones extremadamente inestables y reactivos, que pueden provocar daño celular y tisular (Piccione *et al.*, 2012), como la LPO (Gibson *et al.*, 2000). Quienes practican disciplinas deportivas en las montañas (esquí, montañismo en sus diferentes modalidades), experimentan sensaciones de falta de oxígeno y disminución de la función muscular, asociada a la hipoxia por la elevada altitud en que se encuentren (Askew, 2002). En diferentes trabajos se ha demostrado que la exposición hipóxica del ejercicio incrementa los indicadores de estrés oxidativo en el organismo (Yoshikawa *et al.*, 1982; Avellini *et al.*, 1999; Hoshikawa *et al.*, 2001; Ilavazhagan *et al.*, 2001); así, se concluye que la hipoxia disminuye la capacidad antioxidante del organismo. Otros autores (Chiaradia, 1998; Ono *et al.*, 1990; Marlin *et al.*, 2002; Kinnunen *et al.*, 2005a; Al-Qudah y Al-Majali, 2006; Yur *et al.*, 2008) mencionan que el ejercicio muscular intenso incrementa la producción de RL en

el sistema músculo-esquelético durante la hipoxia generada, contribuyendo a una disminución en el rendimiento muscular (Mohanraj *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando el trabajo físico se realiza en zonas de altitud elevada, la baja disponibilidad de O₂ permite una hipoxia tisular aguda o crónica, que provoca una reducción en el flujo sanguíneo cardiaco, pero lo aumenta en el músculo esquelético para realizar la actividad (Wagner, 2000). En los caballos, el estrés oxidativo provoca serios daños durante el ejercicio, en términos de fatiga muscular y miopatías; el uso de antioxidantes ayuda a disminuir su desarrollo (Soffler, 2007).

El elevado consumo de O₂ por parte de las células musculares o miocitos conlleva a una gran producción de RL, pero también se incrementa la actividad enzimática antioxidante. Por ejemplo, la SOD y la GPx incrementan su actividad en los miocitos del caballo en respuesta al trote moderado. Los miocitos tienen mecanismos para reducir el daño oxidativo, no sólo enzimáticos (SOD, GPx y CAT), sino también no enzimáticos (vitaminas: E, C, β-caroteno, y glutatión). Los RL formados durante las jornadas de ejercicio intenso pueden afectar temporalmente los mecanismos antioxidantes (Askew, 2002) y generar marcadores de peroxidación lipídica (Halliwell, 2012), como los TBARS e isoprostanos, por mencionar algunos. Se ha establecido que la intensidad y la duración del ejercicio y las condiciones ambientales son factores primarios para inducir la carga pro-oxidante (Williams *et al.*, 2005). Si bien en el atleta humano se ha demostrado la relación que existe entre el ejercicio y el daño muscular oxidativo, en el caso del caballo la información es aún limitada (Kinnunen *et al.*, 2005a). En el humano se ha determinado que la xantina oxidasa se encuentra involucrada en la formación de RL después del ejercicio, pero la inhibición de esta enzima por el alopurinol disminuye el daño muscular, así como el estrés oxidativo asociado directamente a un ejercicio exhaustivo (Vinña *et al.*, 2000).

Tanto el ejercicio aeróbico como el anaeróbico tienen efectos sobre la producción de RL (Grousard *et al.*, 2003). En etapas tempranas, las ERNs generadas durante el ejercicio activan a los antioxidantes enzimáticos, por lo que pueden dañarse algunas biomoléculas específicas, en función de la cantidad de ERNs producidas y de la capacidad del organismo

para contrarrestarlas (Hagget *et al.*, 2010; Krumrych, 2010; Wagner *et al.*, 2010; Calamari *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2011; Tadich *et al.*, 2013). De esta forma, cuando el ejercicio es de baja intensidad, los antioxidantes pueden eliminar a las ERNs generadas, pero conforme aumentan la intensidad y duración de la actividad física, así como la cantidad de ERNs, se rebasa la capacidad antioxidante del organismo y los tejidos, ya sea en humanos (Knez *et al.*, 2007) o en los caballos (Williams y Burk, 2012), sufren daño. Otros factores que influyen en la generación de RL en equinos (Siciliano *et al.*, 1997) y en humanos (Watson *et al.*, 2005) son la edad, el grado de entrenamiento y la dieta cotidiana.

2.4 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son la principal línea de defensa que tiene el individuo para disminuir la cantidad de RL y evitar el estrés oxidativo (figura 5), disminuyendo la posibilidad de daño celular. Las moléculas con actividad antioxidante pueden ser de tipo enzimático y no enzimático (cuadro 2.8). Como ya se ha indicado, los principales antioxidantes enzimáticos son la SOD, la GPx y la CAT. En el grupo de antioxidantes no enzimáticos, entre otras moléculas, están la vitamina E, los carotenoides y la vitamina C, que contribuyen a la estabilización de los RL, deteniendo la reacción en cadena del daño oxidativo celular.

La actividad catalítica de SOD, GPx y CAT permite la transformación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y, finalmente, a agua metabólica (H_2O), logrando inactivar grandes cantidades de oxidantes. Algunos elementos traza tienen un papel catalítico importante, ya que son parte estructural de estas enzimas: Zn, Cu y Mn para SOD; Se para GPx, y Fe para CAT.

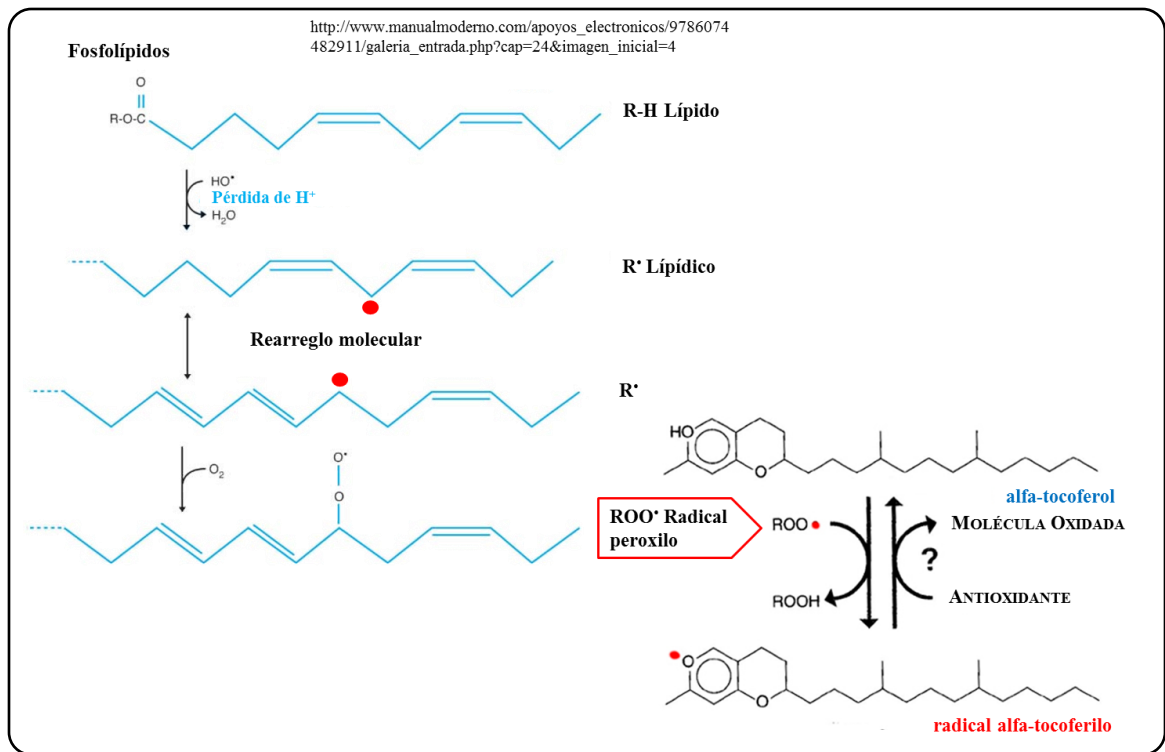


Figura 2.5 Acción antioxidante del α -tocoferol para reparar un fosfolípido oxidado.

La mayoría de los antioxidantes endógenos son moléculas de bajo peso molecular y se agrupan arbitrariamente en dos grupos: hidrofóbicos e hidrofílicos, siendo la excepción el ácido lipoico, que presenta las dos actividades (Bast y Haenen, 2003). Entre los principales antioxidantes hidrofóbicos se encuentran el α -tocoferol (vitamina E), el β -caroteno (vitamina A), flavonoides, ubiquinol (coenzima Q-10), bilirrubina y melatonina, que son protectores lipídicos de las reacciones en cadena de la peroxidación (Vladimirov, 1998; Kirschvink *et al.*, 2008). En el caso de humanos, el ácido gálico, un antioxidante derivado del polifenol y sus componentes propiamente hidrofóbicos, son generalmente más efectivos en evitar daños derivados del estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas (Lu *et al.*, 2006).

Cuadro 2.8 Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Antioxidantes	Localización	Propiedades
Enzimáticos		
Superóxido dismutasa (SOD)	Mitocondria y citosol	Dismuta al radical superóxido a peróxido de hidrógeno; contiene Cu, Zn o Mn
Glutación peroxidasa (GPx)	Mitocondria y citosol	Remueve peróxido de hidrógeno e hidroperóxido orgánico; contiene Se
Catalasa (CAT)	Mitocondria y citosol	Remueve peróxido de hidrógeno; contiene Fe
No enzimáticos		
Carotenoides	Membrana celular	Detector de las especies reactivas al oxígeno
Vitamina C	Fase acuosa de la célula	Ayuda a reciclar a la vitamina E
Vitamina E	Membrana celular	Mayor detonador para detener la reacción en cadena del estrés oxidativo de la membrana celular.
Ácido Úrico	Producto del metabolismo de las purinas	Detector de los radicales –OH
Glutación	Célula	Actúa como defensa en varios roles antioxidantes a nivel celular
Ácido alfa-lipoico	Endógeno	Efectivo en reciclar a la vitamina C; puede ser un efectivo sustituto del glutación.
Bilirubina	Sangre	Antioxidante extracelular
Ubiquinonas	Mitocondria	Antioxidante
Transferrina, ferritina, lactoferrina	Sistémico	Quelación de los iones metálicos

Como antioxidantes hidrofílicos se pueden mencionar el glutación, tanto en su forma reducida (GSH) como oxidada (GSSG), el ácido úrico, el ácido ascórbico (vitamina C), los proteoglicanos y el ácido hialurónico, los cuales protegen contra la LPO, así como de la oxidación de proteínas, de carbohidratos y de material nuclear (Kirschvink *et al.*, 2008). El

ácido ascórbico es un caso particular; está considerado un antioxidante primario, que se localiza en el plasma y en las células, actuando en la membrana plasmática, donde dona sus electrones al radical α -tocoferoxil, ayudando, así, a la reparación de la vitamina E y contribuyendo a la protección de los lípidos de la membrana celular (May, 1999). En el caballo y en el ser humano, la vitamina C constituye el primer antioxidante del sistema respiratorio (Deaton *et al.*, 2004; Youssef *et al.*, 2013). Vladimirov (1998) incluye también en este grupo a la CAT y la GPx, a la ceruloplasmina y a la transferrina en la sangre y a la carnosina en otros tejidos.

El ácido lipoico es tanto hidrofóbico como hidrofílico y participa en las reacciones mitocondriales de descarboxilación-deshidrogenación (con los complejos piruvato deshidrogenasa y alfa-cetoglutarato deshidrogenasa). El lipoato, cuya forma reducida se conoce como dihidrolipoato, reacciona en contra de los radicales hidroxil, superóxido, peroxil, oxígeno singlete y el ácido hipocloroso; además, protege las membranas biológicas interactuando con la vitamina C y el glutatión, el cual ayuda al reciclaje de la vitamina E. Sin embargo, el dihidrolipoato puede tener una acción pro-oxidante a través de la reducción de Fe. La suplementación con ácido alfa-lipoico ha mostrado beneficios en la reversión de daños por estrés oxidativo, tales como procesos de isquemia y reperfusión, diabetes, formación de cataratas, neurodegeneración y daño por radiación. El lipoato puede contribuir a regular procesos de óxido-reducción de las proteínas (mioglobina, prolactina, tiorredoxina y el factor de transcripción NF-kB) (Lester *et al.*, 1995).

Los antioxidantes también se agrupan de acuerdo con su origen en endógenos (sintetizados por el animal) y exógenos (adquiridos con la dieta o por vía parenteral). Además, es posible clasificarlos de acuerdo con su peso molecular (cuadro 2.9).

Cuadro 2.9 Antioxidantes endógenos y exógenos de acuerdo a su peso molecular (*Durackova, 2010*).

Alto peso molecular	Bajo peso molecular
Superóxido dismutasa	Ácido úrico
Glutación peroxidasa	Vitamina C (ácido ascórbico)
Catalasa	Ácido lipoico
Albúmina	Glutación
Transferrina	Vitamina E (α -tocoferol)
Metalotioneínas	Ubiquinol
	Flavonoides

Aun cuando existen técnicas para cuantificar las concentraciones de los diferentes antioxidantes, no se ha llegado a tener la información que permita inferir sobre el grado de estrés oxidativo que presenta un individuo.

2.4.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Dado que este estudio de investigación se enfocó en la GPx y a la SOD, se abordan en mayor grado estas dos enzimas y se presenta una breve información acerca de la CAT.

CATALASA

La CAT (EC 1.11.1.6) juega el mayor papel en la defensa celular antioxidante, pues descompone el H_2O_2 y evita la formación del radical hidroxil por medio de la reacción de Fenton (Ho *et al.*, 2004), disminuyendo en forma importante el efecto detrimental de las EROs (Jiang *et al.*, 2001). Se encuentra en los peroxisomas de los eucariotes, contiene un

grupo hem en su sitio activo responsable de la actividad catalítica y es el mayor detector enzimático de H_2O_2 en todos los organismos aeróbicos (Yang y Poovaiah, 2002). Toma dos H_2O_2 del medio para transformarlos en dos H_2O y O_2 (Michiels, 1994).

SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad de la SOD (EC 1.15.1.1) fue descubierta por McCord y Fridovich (1969). Esta enzima es necesaria para mantener la vida en condiciones aeróbicas (Michiels *et al.*, 1994) y se han identificados dos tipos en los mamíferos: 1) SOD que contiene Mn y se localiza principalmente en la matriz mitocondrial y 2) SOD que contiene Cu y Zn, localizada sobre todo en el citosol (Zidenberg-Cherr *et al.*, 1983) y responsable de convertir el superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Juárez *et al.*, 2008). Se ha encontrado SOD extracelular en los testículos humanos (Mruk *et al.*, 2002) y en los espermatozoides de los caballos (Baumber *et al.*, 2013). En ausencia de la SOD, el anión superóxido puede generar radicales hidroxilo, los cuales pueden desencadenar la peroxidación lipídica. Tanto la dieta como las condiciones ambientales influyen en la actividad de la CuZnSOD y la MnSOD, enzimas que aumentan su actividad bajo condiciones que favorecen la producción de radicales superóxido. En ratas con consumo crónico de etanol se afectó la función de la SOD (Zidenberg-Cherr *et al.*, 1983).

GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

La glutatión peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9) es una familia de enzimas cuya principal acción es mantener la homeostasis de los H_2O_2 , utilizando al glutatión reducido (GSH) para formar agua (Chen *et al.*, 2016). En los mamíferos, se han identificado 8 miembros de esta familia, que se agrupan en dos clases de GPx:

a) GPx que contienen Se-cisteína (GPx1 a GPx4 y GPx6), éstas catalizan la reacción entre el H_2O_2 acoplado a la oxidación del glutatión reducido (GSH) para formar H_2O metabólica y O_2 . La estructura de GPx1, GPx2 y GPx3 es tetramérica, con cuatro

subunidades idénticas de alrededor del 22 kD; cada una contiene un átomo de Se, incorporado a la cisteína que está involucrada con su sitio catalítico (Michiels *et al.*, 1994). La estructura de GPx4 es monomérica. La actividad enzimática de esta familia está asociada al consumo de Se, especialmente para las formas 1-4 (Mehdi, 2013). La GPx-1 se distribuye ampliamente en el individuo, siendo abundante en los eritrocitos, hígado, riñón y pulmones, así como en la membrana celular (Hamanishi *et al.*, 2004). Su principal actividad es antioxidante y la deficiencia de Se la afecta rápidamente (Fairweather-Tait *et al.*, 2010). La GPx2 en humanos se localiza predominantemente en el tejido gastrointestinal y en el hígado; protege del daño oxidativo y presenta un 65 % de analogía con la GPx1 (Mehdi, 2013); reduce los hidroperóxidos de los AGPi, utilizando NADPH+H⁺ como donador de electrones (Gaber *et al.*, 2006). La GPx3 se localiza en el líquido extracelular y representa del 10 al 30 % del Se plasmático; además, se encuentra en el hígado, riñones, corazón, pulmones, tiroides, tracto gastrointestinal, en la placenta y en el sistema reproductor del macho (Mehdi, 2013). Actúa como antioxidante plasmático y reduce los hidroperóxidos lipídicos. La actividad ineficiente de la GPx3 se asocia con accidentes cerebrovasculares en los humanos (Bierl *et al.*, 2004). La GPx4 se distribuye de forma extensa en el organismo y mantiene gran actividad en los testículos, donde se le encuentra en el citosol, mitocondria y núcleo. Tiene actividad antioxidante, protegiendo a la membrana de la LPO; por otra parte, cataliza la conversión de los hidroperóxidos de colesterol y de sus ésteres a derivados menos tóxicos. Protege del daño oxidativo al ADN. También contribuye a regular las vías 15-lipooxigenasa y 5-lipooxigenasa. La GPx4 es fundamental para la fertilidad, maduración, función y motilidad espermática (Maiorino *et al.*, 2003). La GPx6 se encuentra sólo en el epitelio olfatorio de humanos (Toppo *et al.*, 2008); es homóloga a la GPx-3 y sus funciones aún no se describen totalmente.

b) GPx que no poseen Se-cisteína (GPx5, GPx7 y GPx8), este grupo muestra baja actividad de peroxidasa (Herbette *et al.*, 2007), por lo que no destruye al H₂O₂, sino que permite su acumulación (Lucero Pérez, 2008) y actúa utilizando proteínas intermediarias. La GPx5 se encuentra en el núcleo espermático, en los embriones y en el epitelio olfatorio; su función aún no está del todo especificada, pero posee entre 60 y 70 % de identidad con la GPx6 (Doyen *et al.*, 2006). En lo referente a la GPx7, hay una asociación negativa entre

ella y las células cancerosas; se localiza en la luz del retículo endoplásmico (Mehdi, 2013). Además, ante el estrés oxidativo actúa como sensor intracelular que detecta el estatus de óxido-reducción y transmite las señales de las EROs a proteínas-SH intermediarias, cuyo grupo SH detecta las señales de óxido-reducción ayudando a regular procesos biológicos, como es el plegamiento de las proteínas (Chen *et al.*, 2016). La GPx8 es una proteína membranal del retículo endoplásmico y la última de la familia de las glutatión peroxidases que se han descubierto (Mehdi, 2013; Chen *et al.*, 2016).

2.4.2 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Los antioxidantes no enzimáticos (tioles, vitamina C y vitamina E) son indicadores de la capacidad antioxidante de los organismos (Costantini y Verhulst, 2009). En este apartado se revisa principalmente información correspondiente a la utilización digestiva y metabólica de los antioxidantes utilizados en este estudio para suplementar a los caballos: selenio y vitamina E. Sólo se hace una breve referencia al papel antioxidante del zinc y cobre, por estar ligados al papel antioxidante de la SOD citosólica en los hematíes, y a la vitamina C, considerada un antioxidante para la salud respiratoria del caballo.

MICRO NUTRIMENTOS INORGÁNICOS (MINERALES)

SELENIO

El selenio (Se) es un elemento químico, con número atómico 34, de naturaleza no metálica o metaloide, cuya configuración electrónica es muy parecida a la del azufre (S); por ello, puede incorporarse en lugar de este último a los aminoácidos metionina y cisteína. Además, el Se se ha encontrado en al menos 30 selenoproteínas, cada una con una distribución tisular específica; en el cuadro 10 se presentan las más estudiadas (Steinbrenner *et al.*, 2016).

El Se es necesario para la biosíntesis de la testosterona y una espermatogénesis normal (Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2008). Funciona como un potente antioxidante, que remueve

peróxidos y forma parte estructural de la GPx (Lucero-Pérez, 2008). Se ha demostrado que el Se disminuye los efectos de la LPO en humanos (Rayman, 2000) y en animales (Chung *et al.*, 2007; Akil *et al.*, 2011). También tiene efectos benéficos en el sistema inmune (O'Brien, 2010; Montgomery *et al.*, 2012), sobre todo en el número y actividad de linfocitos y granulocitos. Sin embargo, se requiere realizar más investigación ante los diferentes trabajos que realizan los caballos y en diferentes ambientes (Pagan *et al.*, 2006).

Cuadro 2.10 Selenoproteínas y su actividad (*A partir de Steinbrenner et al., 2016*)

Selenoproteína	Actividad
Tres, tiroxina reductasa (TrxR)	Participa en la reducción de diferentes sustratos incluyendo a las tioredoxinas 1 y 2, H ₂ O ₂ e hidroperóxidos orgánicos.
Metionina sulfóxido 2, reductasa (MsrB)	Reduce a metionina, la metionina sulfóxido libre o ligada a proteína
Selenoproteínas plasmáticas (SePP1)	Transporta Se en el plasma y posee una leve actividad antioxidante
Iodotironinas deiodinasas	Regulación de las rutas metabólicas por la activación o desactivación de la hormona tiroidea
Siete, selenoproteínas del retículo endoplásmico	Control del plegamiento de las proteínas y regulación de la homeostasis del Ca ²⁺

La deficiencia del Se en animales se manifiesta por el desarrollo de distrofias musculares (Lofstedt, 1997; Huntington *et al.*, 1999), inmunodepresión (Stabel *et al.*, 1989; Knight y Tyznik, 1990), necrosis y fibrosis miocárdica, miocarditis linfocitaria (Orr y Blakey, 1997) y disminución en la destrucción de los radicales libres, ya que se afecta la síntesis de la GPx (*ver apartado correspondiente*) (Rotruck *et al.*, 1973). Además, afecta la reproducción, pues se presentan abortos, hay pérdida de la motilidad de los espermatozoides y aumentan las anormalidades de la cola en las ratas, verracos y ratones y también disminuye el número de células germinales (Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Si bien el Se es un micronutriente esencial, también es altamente tóxico. El Se es el único mineral cuya dosificación alimentaria está estrictamente regulada por la Federal Drug Administration (FDA, EUA) y tiene un margen de seguridad muy estrecho. El caballo es uno de los animales más sensibles a la toxicidad por el elemento, tanto aguda como crónica, siendo esta última la toxicidad de origen alimentario más frecuente. En el caballo se presenta el cuadro conocido como “vértigo ciego o enfermedad del álcali”, caracterizado por alopecia, quebrantamiento del casco alrededor de la banda coronaria y desprendimiento del tejido córneo. El National Research Council (2007) ha recomendado la máxima dosificación de 0.3 mg/kg MS. Se menciona que la dosis máxima para un equino es de 0.5 mg Se/kg MS y la dosis máxima no debe exceder los 2 mg/kg de MS. Cabe mencionar que las fuentes inorgánicas del elemento, selenito (Na_2SeO_3) y selenato de sodio (Na_2SeO_4), son más tóxicas que las formas orgánicas (Se-levadura, Se-metionina y Se-cisteína).

Las Fuentes de Selenio (inorgánicas y orgánicas)

El Se en forma pura se encuentra formando cristales de color rojo o gris; en la naturaleza se encuentra combinado con sulfuro o sales de metales (plata, cobre, plomo y níquel). Las fuentes de Se inorgánico aceptadas y utilizadas en la alimentación son sus sales de sodio, selenito y selenato (Na_2SeO_3 y Na_2SeO_4 , respectivamente). El selenito de sodio es la forma más utilizada cotidianamente dado su menor costo, su contenido del metaloide (45.66 %) y su elevada biodisponibilidad (100 %). El selenato de sodio contiene 41.79 % de Se. Ambas fuentes representan un elevado riesgo toxicológico y su absorción intestinal (principalmente en el duodeno) es baja, al igual que su retención en el organismo (Chung et al., 2007).

Por otra parte, el Se orgánico es producido por las levaduras, mismas que son cultivadas proporcionándoles cantidades elevadas de Se inorgánico. La levadura lo incorpora a su organismo sintetizando Se-metionina, o bien Se-cisteína. Estas levaduras logran incorporar cantidades importantes del mineral. Este Se es bien utilizado a nivel digestivo (Richardson et al., 2006; Calamari et al., 2010), incorporado a los tejidos del individuo y su toxicidad es menor.

Absorción

La absorción de Se ocurre primordialmente en el intestino delgado y el consumo no la influye, pero su estado de oxidación sí es importante. Los selénidos que son biológicamente activos no se absorben en el organismo. El selenito debe metilarse a dimetil selénido para absorberse por difusión pasiva en la primera porción del íleon; después perderá los metilos y el Se podrá incorporarse a la metionina o cisteína (Lucero-Pérez, 2008). El transporte de selenato es sodio dependiente y ocurre en el íleon por transporte activo, estableciéndose una competencia con el sulfato y otros óxidos metálicos (plomo, arsénico, calcio y Fe^{+2} , Fe^{+3}). En tanto, el Se orgánico requiere de un transportador para aminoácidos neutros por el que compiten la Se-metionina y la Se-cisteína, lo que regula la rapidez del proceso. La absorción es de un 80 % en las aves y los cerdos, pero sólo de 29 % en las ovejas. La absorción de la selenometionina es mayor al 90 % en los no rumiantes, incluyendo a las aves. Como puede observarse, la eficiencia de la absorción intestinal es mucho menor en los rumiantes que en los no rumiantes, lo que se atribuye a la reducción del selenito y selenato a selénidos, que son menos disponibles para los rumiantes (Mehdi et al., 2013).

Transporte

Tras su absorción, el eritrocito capta rápida y selectivamente al Se inorgánico, que es reducido a selénido en el glutatión (GSH) por la glutatión reductasa, donde durará poco tiempo para después reincorporarse a la circulación. En el eritrocito existen dos proteínas que contienen Se (GPx1 y GPx3), mientras que en el plasma hay tres selenoproteínas: GPx, selenoproteína P (SePP1) y albúmina, que sirven como proteínas transportadoras. Entre el 1 y 2 % del Se plasmático se encuentra unido a la GPx (Mehdi *et al.*, 2013). El Se también se encuentra unido a globulinas α y β , las cuales presentan gran afinidad por el elemento, a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL). En la GPx y la albúmina, el Se está unido en el sitio activo a una metionina y en el caso de la SePP1, se une a una cisteína (Lucero-Pérez, 2008). Como selénido, el metaloide se transporta al hígado (Mehdi *et al.*, 2013) y a otros órganos.

Después de que los selenoaminoácidos son absorbidos y entran a la circulación sanguínea, el suero y el plasma tienen concentraciones similares de Se, por lo que son un indicador a corto plazo del estado de Se del individuo. La suplementación con Se orgánico produce mayores concentraciones de Se en el suero que el Se inorgánico. El Se que no se incorpora a las estructuras sanguíneas, principalmente la Se-metionina, se distribuye a otros órganos. Se ha demostrado que la SePP1 juega un papel importante en el transporte de Se a los tejidos y que es responsable de llevar el Se del hígado a otros tejidos como riñones, corazón, testículos y cerebro (Lucero-Pérez, 2008).

Distribución en los Tejidos

La distribución del Se en los tejidos se ha estudiado utilizando fuentes orgánicas o inorgánicas e isótopos en ratas (^{75}Se) y en humanos (^{74}Se o ^{82}Se). Los resultados muestran que el Se se transporta prioritariamente al hígado y a los riñones y, en el caso de los humanos, a los riñones y al hígado. El hígado y el riñón almacenan hasta el 32 % y 6 %, respectivamente, del Se total del organismo. El plasma y los eritrocitos contienen entre 7.5 % y 7.9 % y el tejido muscular resulta el mayor sitio de almacenamiento, con aproximadamente 40 % (Lucero-Pérez, 2008). La deposición del Se en los órganos se ve favorecida por el Se orgánico. Esto fue demostrado en el músculo y cerebro de ratas (Lucero-Pérez, 2008).

Metabolismo

El Se, tanto orgánico como inorgánico, se reduce a selénido en el GSH; sin embargo, el orgánico primero debe anclarse por puentes carbono-Se por β -liasas. El selénido se utiliza

para la síntesis de proteínas y son proteínas las que lo anclan. Si no se incorpora a las moléculas, se excreta como metabolitos metilados (Lucero-Pérez, 2008).

1. Conversión de selenato a selenito, que involucra a los intermediarios activos, adenosín fosfoselenato (APSe) o fosfoadenosín fosfoselenato (PAPSe).
2. Reducción no enzimática de GSH al estado de oxidación cero del Se^0 , “selenodiglutation” (GS-Se-SG).
3. Reducción del GS-Se-SG a selenopersulfido (GSSeH) por la glutatión reductasa en presencia de $\text{NADPH}+\text{H}^+$.
4. Bajo condiciones anaeróbicas, el GSSeH puede convertirse en un selénido ácido volátil por la acción de la glutatión reductasa en presencia de $\text{NADPH}+\text{H}^+$, o bien, por una reducción no enzimática por exceso de GSH.
5. En el hígado, el selénido puede metilarse utilizando S-adenosilmetionina, por la metiltransferasa citosólica o microsomal; o bien, puede metilarse a metilselenol.
6. A dimetilselenido que se elimina en la espiración.
7. A trimetilselenon que se elimina por la orina.
8. El selénido puede ligarse no enzimáticamente a proteínas de unión de Se y causar toxicidad.
9. La selenometionina se incorpora a las proteínas, incluyendo la muscular, la eritrocitaria, en el páncreas, hígado, riñones, estómago y la mucosa gastrointestinal.
10. La selenometionina puede también utilizarse para formar selenocisteína, lo que involucra dos etapas: la selenometionina forma [Se]-adenosil metionina (SeAM), un excelente donador de grupos metilo en los mamíferos, que, a su vez, forma [Se]-adenosil homocisteína (SeAH), que se une a la serina por acción de la cistationina β -sintetasa y forman cistationina. Ésta sufre la acción de la γ -cistationina liasa y se sintetiza la selenocisteína en los tejidos de mamíferos. La selenometionina no

utilizada puede formar metiloselenuo (paso 15) mediante una reacción de transaminación.

11. La selenocisteína se degrada a Se elemental por la selenocisteína liasa.
12. El Se elemental se reduce no enzimáticamente a selénido por el GSH o por un grupo tiol (Lucero-Pérez, 2008).

Excreción

El Se se elimina del organismo por la orina, las heces y la espiración. La orina es la principal ruta de excreción de Se en los no rumiantes. La excreción urinaria de Se dependerá de la cantidad y forma química ingerida, ingredientes de la dieta, estatus de Se del individuo y funcionamiento renal. En los rumiantes, la excreción urinaria se convierte en una ruta de excreción secundaria y la excreción fecal es la principal debido a su utilización digestiva poco eficiente. La salida de Se por la leche es muy baja, alrededor de 50 µg/L (Mehdi *et al.*, 2013).

La figura 2.6 muestra de forma integral el metabolismo del selenio tras su ingestión, además de la excreción.

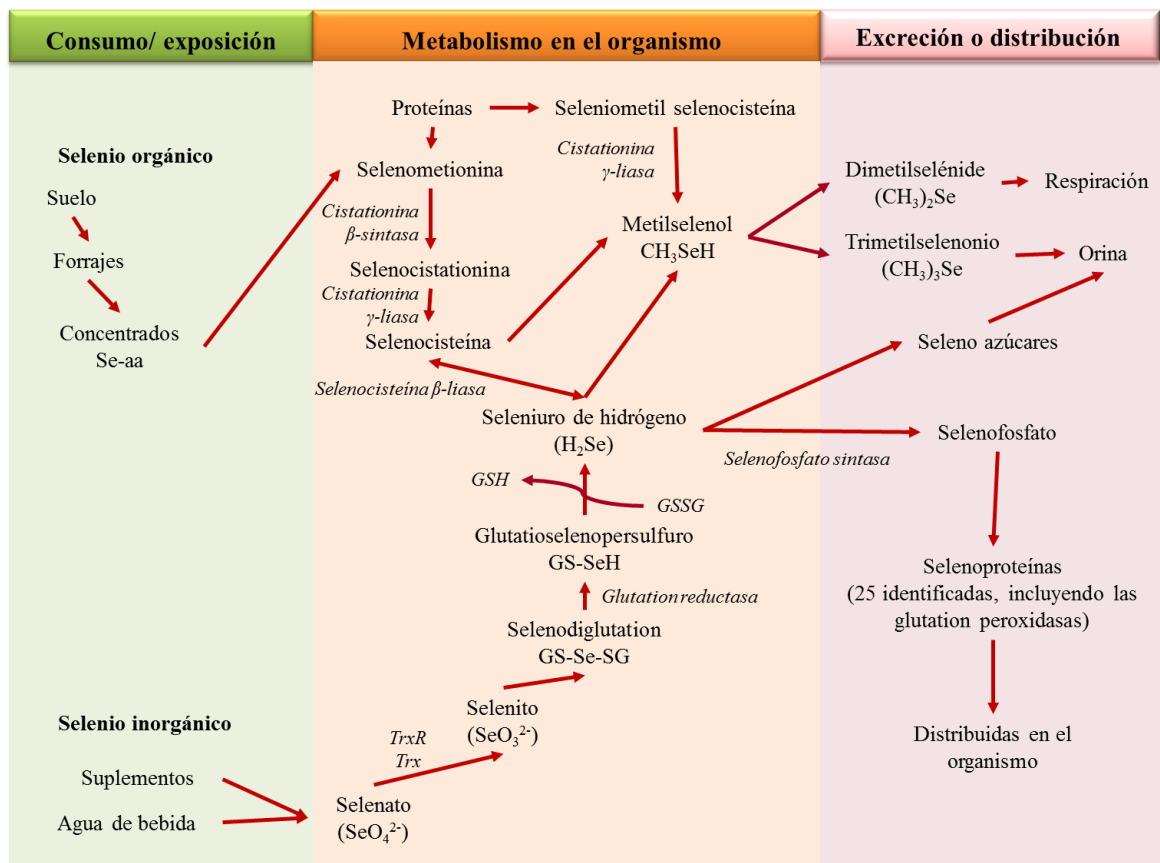


Figura 2.6 Consumo/exposición, metabolismo, distribución y excreción del selenio en el organismo animal. TrxR, tioredoxina reductasa; Trx, tioredoxina. (A partir de Brinkman et al., 2006; Mattmiller et al., 2013).

ZINC

El zinc (Zn, número atómico 30) es un metal esencial para los individuos. Es parte estructural de enzimas (anhidrasa carbónica, las carboxipeptidasas A y B, fosfatasa alcalina, alcohol deshidrogenasa, colagenasa, leucina aminopeptidasa, mono-oxidasa), participa en la osteogénesis y en la función reproductiva. El Zn previene enfermedades crónico-degenerativas como la arterioesclerosis, diabetes y desórdenes neuro-degenerativos. En los humanos contribuye a evitar la enfermedad de Parkinson y la degeneración macular. Aunado a esto, participa como mediador de la inmunidad celular, actuando como agente antioxidante y antiinflamatorio; disminuye la incidencia de infecciones, el estrés oxidativo

y la producción de citocinas inflamatorias (Prasad, 2014); además, reduce el daño en el ADN (Sharif *et al.*, 2015). En ratas, disminuye los daños atribuidos a la LPO

Este metal es uno de los elementos más abundantes en el medio ambiente, por lo que es difícil observar cuadros de deficiencia, en los que se presenta estomatitis, paraqueratosis, pelo áspero, rigidez articular, trastornos reproductivos como atrofia testicular, disminución de la libido y de la testosterona sérica (el carnero es muy sensible a la alteración de la eficiencia reproductiva por deficiencia de Zn), además de que se observa un aumento del MDA (Bashandy *et al.*, 2016). El Zn realiza su función antioxidante a través de proteínas, como las metalotioneínas, además de formar parte estructural de la SOD, en relación con el cobre (Bashandy *et al.*, 2016). El Zn facilita la neutralización de radicales libres (Cruz *et al.*, 2015). Las recomendaciones alimentarias son de 50 mg/kg MS (Martin-Rosset, 2012). La toxicidad por Zn es poco frecuente, ya que tiene un amplio margen de seguridad en el caballo (NRC, 2007).

COBRE

El cobre (Cu, número atómico 29) es un metal esencial para el organismo animal, donde se puede encontrar como Cu^{2+} , cuproso, o Cu^{3+} , cúprico. Es un importante factor para la incorporación del hierro a la hemoglobina, participa en la osteogénesis, en la pigmentación de la piel, iris y faneras, es cofactor enzimático (citocromo oxidasa C, tirosinasa, monoaminooxidasa, ceruloplasmina, galactosidasa) y forma parte de proteínas sin actividad enzimática (eritrocupreína, hepatocupreína, cerebro cupreína, proteína cúprica de la leche), además de ser parte estructural de la SOD citosólica (Kamiya *et al.*, 2018), abordada anteriormente por su papel antioxidante. Adicionalmente, participa en la expresión genética.

La deficiencia de Cu se asocia con una disminución en la efectividad del sistema inmune, anemia, fracturas, acromotriquia, ataxia, parálisis espástica, incoordinación severa, daño cerebral, alteración en la función de la cadena respiratoria. Los ovinos son la especie más

susceptible a su toxicidad y los caprinos, a su deficiencia. En el caso de los humanos, se ha relacionado en ocasiones con alteraciones cardiometabólicas, como la resistencia a la insulina y la diabetes, asociados a la obesidad (Acosta-García *et al.*, 2017).

Su principal papel como antioxidante es su participación en la estructura de la SOD. Esta enzima se presenta tanto en animales como en plantas, donde funciona como un eficiente detoxificador de las EROs (Pulido, 2014). En el caballo, las recomendaciones alimentarias para el Cu son de 10 mg/kg MS (Martin-Rosset, 2012); con una resistencia importante a la intoxicación, que se indica hasta 250 mg/kg de alimento (NRC, 2007).

MICRO NUTRIMENTOS ORGÁNICOS (VITAMINAS)

VITAMINA C

La vitamina C o ácido ascórbico de naturaleza hidrosoluble (Kirschvink *et al.*, 2008; O'Brien, 2010) tiene propiedades antioxidantes en el fluido extracelular que actúa contra las EROS y tiene la capacidad de regenerar la estructura y por ende la actividad de la vitamina E (Abdel-Khalek *et al.*, 2008). Esta vitamina protege a las membranas de la LPO al eliminar los radicales peroxilo en la fase acuosa antes de iniciar la fase de peroxidación (McDowell, 2002). La vitamina C es altamente potente en los fagocitos, que, para destruir a los agentes extraños al individuo, generan RL y EROs (McDowell, 2002).

El caballo en mantenimiento tiene la capacidad de sintetizar suficientes cantidades de ascorbato, cuya demanda aumenta cuando hay estrés. La interacción entre las vitaminas C y E fue estudiada en caballos de “endurance” y se encontró que ambas vitaminas aumentaron la GPx eritrocitaria. La suplementación con ambas vitaminas aumentó la concentración de vitamina C en el plasma en relación con los animales que sólo recibieron vitamina E. La diferencia entre los grupos fue disminuyendo cuando se realizó actividad física, lo que se atribuyó a una movilización del almacenamiento intracelular de la vitamina C por parte del grupo vitaminado sólo con vitamina E. El grupo que recibió E + C mantuvo sus niveles de ácido ascórbico en el plasma utilizando una fuente alimentaria (Williams, 2010). En

caballos PSI la vitamina C ayuda a reducir el efecto del estrés oxidativo, pero no evita el daño muscular (White *et al.*, 2001). Además, es un efectivo protector del sistema respiratorio (Deaton *et al.*, 2004), donde funciona como el antioxidante principal. En conejos, la vitamina C, además de reducir el estrés oxidativo, mejoró los parámetros reproductivos (Gliozzi *et al.*, 2009).

VITAMINA E

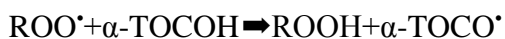
La vitamina E se considera un potente antioxidante. Sin embargo, aún se debaten las dosis adecuadas para tener efectos benéficos en la salud equina (DellaPenna y Mène-Saffrané, 2011). La discusión no versa únicamente sobre las dosis sino también sobre qué forma química debe denominarse como vitamina E. Antes del 2001, se le llamaba vitamina E a la familia de ocho moléculas: cuatro tocoferoles (α , β , γ y δ) y cuatro tocotrienoles (α , β , γ y δ); pero, el consejo de Alimentos y Nutrición de los EUA instruyó que sólo deben denominarse bajo el término de vitamina E a los isómeros del RRR- α -tocoferol: RRS-, RSR- y RSS- (Bendich, 2001).

El conjunto de tocoferoles y tocotrienoles se designa como **tococromanoles**, cuya principal característica es la presencia del anillo croma-6-ol. Los tococromanoles se sintetizan por organismos fotosintéticos, de forma que se encuentran principalmente en las plantas. Los tocoferoles poseen un hidrocarbano saturado, derivado del fitilobifosfato, y los tocotrienoles cuentan con tres dobles ligaduras en su grupo geranil-geranil bifosfato (GGPP). Los tocoferoles tienen tres centros quirales que dan origen a la configuración de los tocoferoles RRR. La isoforma γ -tocoferol tiene mayor potencia antioxidante que la α para actuar contra las especies reactivas del nitrógeno (peroxinitrito, óxido de nitrógeno y otras). Además, se encuentra en menores cantidades en los fumadores, pero su concentración aumenta cuando se suspende el uso del cigarro (Saldeen y Saldeen, 2005; Torquato *et al.*, 2016). Los tocotrienoles tienen un único centro quiral, que se presenta sólo en el D-isómero, tanto en su forma natural como en la mezcla sintética de los tocotrienoles. La mezcla de los ocho esteroisómeros tiene un rango de actividad del 21 al 100 %

(DellaPenna y Mène-Saffrané, 2011). Dada la estructura de los tococromanos, éstos son susceptibles a la oxidación por el oxígeno singlete, la luz y el calor (Sies y Murphy, 1991).

La función más estudiada de los tococromanos es la de ser potentes antioxidantes, que interactúan con los grupos acilo de los AGPi, protegiendo a los lípidos de las membranas de la LPO. La protección se confiere mediante la donación de un H⁺ del anillo de cromanol, convirtiendo al lípido peróxido en una forma menos reactiva (lípido hidroperóxido), por lo que se rompe la cascada de reacciones de la LPO. El producto resultante es el radical tococromanol, el cual es mucho más estable y tiene una vida media mayor que los radicales lípidoperoxil. El radical tococromanol puede regenerarse a tococromanol por acción de la vitamina C (ácido ascórbico), del ubiquinol o de la plastoquinona (Zingg, 2007; DellaPenna y Mène-Saffrané, 2011; Azzi, 2017). El radical tocoferoxilo (α -TOCO[•]) es restaurado por la vitamina C u otro donador de H⁺ (por ejemplo, tioles, como el GSH), recuperando la estructura de la vitamina E (Traber, 2007). Las isoformas α - y γ -tocoferol tienen actividad antioxidante (Saldeen y Saldeen, 2005).

La reacción principal que involucra al radical lípido peróxido y al grupo hidroxilo fenólico del tocoferol para regenerar el hidroperóxido orgánico y el radical peroxil es la siguiente:



El tocoferol es efectivo para inhibir la cadena de las reacciones de peroxidación, aún cuando se encuentre en proporción 1:1000 en relación con las moléculas de AGPi de las membranas biológicas. Cada molécula de tococromanol actúa aproximadamente en 120 cadenas de peroxidación lipídica antes de ser degradada. Un segundo mecanismo protector lo constituye la acción química y física sobre el oxígeno singlete (¹O₂), el cual es un generador de RL, que puede dañar las membranas celulares. La acción física consiste en un mecanismo de transferencia de alta eficiencia de carga y en un disipador térmico que retorna al oxígeno a su forma básica (³O₂), pero el tococromanol no experimenta daño alguno. La acción química, además de calmar el efecto dañino del oxígeno singlete, actúa

contra los RL, dando por resultado la apertura del anillo cromanol y la producción de la respectiva tocoferolquinona, que puede participar en reacciones de transferencia de electrones tanto en plantas como en animales (DellaPenna y Mène-Saffrané, 2011).

Los tocoferoles también inhiben *in vitro* a dosis fisiológicas a enzimas como la proteína cinasa A (Galli *et al.*, 2017). La vitamina E inhibe la actividad de la xantina oxidasa, así como de la lipooxigenasa, ciclooxigenasa-2, fosfolipasa A-2, adenilciclase y fosfodiesterasa; también modula la concentración de isoprostano F₂, que se incrementa en la orina y el plasma en situaciones de daño oxidativo de origen exógeno (Azzi, 2017). La vitamina E mejora la función reproductiva e incrementa la actividad de la SOD en las células espermáticas del toro (Hong *et al.*, 2010). La calidad del semen en diferentes especies, incluida la equina, ha mejorado con la suplementación de vitamina E (Castellini *et al.*, 2007), así como mejora el reinicio de la actividad espermática después de la descongelación (Sikka *et al.*, 2004), la fecundación (Aitken y Clarkson, 1988) y la congelación del semen (Castellini *et al.*, 2007).

La deficiencia de vitamina E se presenta cuando se proporcionan por largos periodos dietas pobres en vitamina E (α -tocoferol) o muy ricas en vitamina A. La deficiencia puede conducir a distrofia neuroaxonal, mioencefalopatía equina degenerativa y enfermedad motoneuronal (Pagan *et al.*, 2005). En el caso del caballo, aún no se han estudiado la isoforma γ -tocoferol y las isoformas de tocotrienoles (Finno y Valberg, 2012). Por otra parte, una ración con elevadas cantidades de vitamina E va a generar una cantidad de moléculas libres, no protegidas, que pueden perder su potencial como rastreadoras de RL, interfiriendo con la señalización celular fisiológica para contrarrestarlos. La vitamina C evitaría este acúmulo excesivo de moléculas de vitamina E en las membranas celulares (Zingg, 2007; Azzi *et al.*, 2016). Los metabolitos de los tocoferoles pueden rastrear también a las EROs y ERNs (Zingg, 2007). El riesgo de presentar fallas cardíacas con dosis excesivas de vitamina E se incrementa 13 % en las mujeres (Azzi, 2017).

Fuentes

Como ya se mencionó, la vitamina E es altamente sensible a las temperaturas altas, la humedad, la luz y a la oxidación; además, reacciona con metales como el hierro y el Cu; por ello, debe evitarse la exposición de los alimentos a estos factores ambientales. Los forrajes verdes presentan de 5 a 10 veces más contenido de vitamina E que los granos y cereales; los tococromanoles acumulados en las hojas tiernas superan a los depositados en los tallos entre 20 y 50 veces (Bauernfiend, 1980). Los cambios en el estado fenológico, la exposición al sol en función directa al tiempo para su deshidratación y el almacenamiento pueden ocasionar hasta 80 % de pérdida de los tococromanoles en los forrajes. Para el caso de los granos, el secado artificial disminuye la pérdida de vitamina E respecto al no secado (se pierden 9.3 vs 20 mg/kg, respectivamente); el uso de antifungales, como el ácido propiónico al 1 %, puede ocasionar la pérdida total de la vitamina. Aunado a lo anterior, los tratamientos tecnológicos como el molido, mezclado, el uso de grasas poliinsaturadas y el peletizado de los concentrados favorece la oxidación de los tococromanoles (Hidiroglou *et al.*, 1992). Las recomendaciones alimentarias diarias oscilan entre 1.2 y 2.0 UI/kg PV, no especificando la fuente, ni raza del individuo (NRC, 2007). Las dosis altas (10 000 UI/día) de DL-tocoferol aumentan las concentraciones séricas de α -tocoferol en individuos con valores deficientes; esta dosis parece no ser adecuada para animales con problemas neurológicos (Pagan *et al.*, 2005).

Comercialmente, existen dos fuentes de la vitamina E:

- a) **α -tocoferil** (all-rac- α -tocoferol, DL-tocoferol): que contiene cantidades iguales de los ocho isómeros y es un producto sintético; esta forma es la que, por su costo, se utiliza comúnmente en las dietas para los animales. Generalmente se une al acetato (acetato de α -tocoferil) para conferirles mayor estabilidad y resistir su desnaturalización.
- b) **α -tocoferol natural** (RRR- α -tocoferol, D-tocoferol): contiene sólo α -tocoferol. Su actividad es dos veces mayor que la de la forma sintética en los bovinos, cerdos y caballos. Además, se dispersa en agua, por lo que es de 5 a 6 veces más disponible que el DL-tocoferol (Pagan *et al.*, 2005). En caballos, la mayor afinidad la tiene

para la proteína transportadora en el organismo (Bondo y Jensen, 2011) y su suplementación en la dieta incrementa las concentraciones séricas de α -tocoferol después de 12 horas de la primera toma. Después de dos semanas de suplementación con α -tocoferol (10 000 UI/día de la forma dispersable en agua), el contenido de este isómero aumentó en el fluido cerebroespinal (Brown *et al.*, 2017). En yeguas gestantes suplementadas con 1678 mg de D-tocoferol 4 semanas antes del parto y 2 días después del parto, se observó un incremento de las concentraciones sanguíneas de α -tocoferol en las yeguas y potros, así como en el calostro. Además, se incrementó la concentración de IgG e IgM en el calostro y la leche y en el plasma del potro a los 3 días de edad (Bondo y Jensen., 2011).

Se ha demostrado el uso de mezclas de α -tocoferol con γ -tocoferol es mucho más favorable que el α -tocoferol solo, actuando en la óxido nítrico sintasa constitutiva y la SOD. Esta mezcla contribuyó a disminuir la formación de trombos, la presencia del anión superóxido en la sangre arterial y la LPO; también disminuyó la oxidación de las LDL y aumentó la actividad de la SOD en el plasma. Asimismo, se observó un aumento en la expresión de la proteína de la SOD para manganeso y la SOD dependiente de hierro y cobre aumentó en el tejido arterial (Saldeen y Saldeen, 2005). Los primeros estudios sobre las funciones de la vitamina E se realizaron en ratas (Simmonds *et al.*, 1927), de forma que la biopotencia de las fuentes se calcularon con base en el mantenimiento de la gestación de esta especie. Así, para el acetato de DL- α -tocoferil (sintético) la biopotencia es de 1.00 mg \equiv 1.00 UI y para el D- α -tocoferol es de 1.36 mg \equiv 1.00 UI (Pagan *et al.*, 2010).

Absorción

Para que la vitamina E se absorba, primero debe liberarse del acetato y debe haber un funcionamiento normal del hígado y del páncreas. Una dieta pobre en lípidos o una baja absorción de éstos (animales prematuros, bajo peso en animales jóvenes, fibrosis cística, by-pass gástrico, enfermedad hepática o pancreática) ocasionarán una absorción deficiente de la vitamina (Azzi, 2017). La esterasa pancreática hidroliza los triglicéridos para liberar

ácidos grasos y también a la vitamina en caso de presentarse esterificada (Finno y Valberg, 2012). La secreción biliar esterifica a la vitamina conjuntamente con los lípidos de la dieta formando las micelas, que penetran al enterocito para la formación de los quilomicrones, a los cuales se incorporará la vitamina E (sin importar su isoforma) (Finno y Valberg, 2012). Sin embargo, el α -tocoferol se absorbe eficientemente, sin modificación molecular alguna, y no es removido por el sistema hepático de destoxificación, por lo que es altamente biodisponible. Los tocoferoles β , γ y δ , así como las cuatro isoformas de los tocotrienoles, no se retienen fácilmente en el organismo y se eliminan. Durante la fase intracelular de la absorción, la vitamina E puede ser metilada, acetilada y conjugada con el ácido glucurónico con la consecuente pérdida de acción antioxidante (Azzi *et al.*, 2016).

La entrada pasiva de la vitamina E a los enterocitos a través de las micelas parece ser la mayor vía de absorción; sin embargo, el receptor scanner clase B tipo I (SR-BI) puede contribuir a la absorción de vitamina E. Este receptor también tiene una importante función en el transporte y consumo de vitamina E en los tejidos (Abumrad y Davidson, 2012).

Transporte

Del intestino al hígado. En la fase intracelular de la absorción, se forman los quilomicrones que, por exocitosis, llegan a la linfa y, vía ducto torácico y vena subclavia izquierda, los remanentes de quilomicron arriban al hígado, pasan entre las células endoteliales de los capilares al espacio de Disse, de donde entran al hepatocito por un mecanismo de endocitosis mediada por receptores de la LDL y de la proteína relacionada a la LDL (LDLR y LRP, respectivamente). El DL-tocoferol es convertido en RRR- α -tocoferol. Una vez en el citosol, la vitamina E se unirá a la proteína citosólica transportadora del α -tocoferol (α -TTP). Ésta selecciona las isoformas RRR- α .tocoferol, ya que su vida media (57 ± 19 h) en el plasma es mayor a la de las otras isoformas (1.2 - 4.0 h); después empaqueta a esa isoforma en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Finno y Valberg, 2012; Galli *et al.*, 2017) o HDL para su secreción hacia el plasma. Así, la

discriminación de las isoformas de vitamina E se lleva a cabo en el hepatocito y no en el enterocito.

Las concentraciones basales en el plasma o suero de vitamina E son diversas en caballos sanos; sin embargo, se han establecido 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como el límite entre un estatus adecuado o deficiente. En comparación con su unión a la forma SRR, es 25 veces más probable que la α -TTP se una al RRR- α -tocoferol (Finno y Valberg, 2012) y hay 100 % de probabilidad de que se una al D-tocoferol natural, 38 % de probabilidad de que se una al β -tocoferol, 9 % de probabilidad de que se una al γ -tocoferol y 2 % de probabilidad de unirse al δ -tocoferol (Galli *et al.*, 2017). Ambas moléculas, la α -TTP y el isómero RRR- α -tocoferol, se localizan en los endosomas y lisosomas del hepatocito. La unión con la α -TTP puede traer consigo un cambio conformacional, pues probablemente actúa como un chaperón para el α -tocoferol, transportando la molécula lipofílica al citoplasma para después llevarla a otros tejidos periféricos. La secreción de α -tocoferol por los hepatocitos hacia el torrente sanguíneo depende de la proteína ABCA1 (ATP-binding cassette, subfamilia A miembro 1). En ratones, las mutaciones en el gen ABCA1 conllevan a un plasma deficiente en vitamina E y a la disminución del consumo hepático de lípidos, aunque las concentraciones de α -tocoferol no se midieron. La α -TTP se ha encontrado, además, en el cerebro y en el útero de ratas gestantes (Finno y Valberg, 2012).

Del hígado a los tejidos. Una vez que se ha ligado a las lipoproteínas en la circulación, el RRR- α -tocoferol se transporta en las LDL. Las HDL también pueden transportarlo, reacción que catalizada la proteína transportadora de fosfolípidos (PLPT) (Finno y Valberg, 2012).

Distribución en los Tejidos

Absorción celular. Se utilizan diversos receptores para la absorción celular del RRR- α -tocoferol en los tejidos periféricos. El receptor transmembranal SR-BI (Scavenger Receptor clase B tipo 1) es clave en el consumo de vitamina E y en otros tejidos. Por ejemplo, el consumo del sistema nervioso central parece depender del SR-B1, ya que en ratones, una deficiencia de estos receptores se manifiesta en una disminución de hasta 70 % en la captación del α -tocoferol en el cerebro. El SR-B1 pertenece a la familia de proteínas que contienen el dominio CRAL-TRIO (proteína celular ligadora del retinoaldehído - factor de intercambio de la guanina). La α -TTP y la proteína asociada al tocoferol (TAP), que muestra un transporte débil y no tiene afinidad selectiva por los tocoferoles (25 veces menos que el α -TTP para el α -tocoferol), contienen el mencionado dominio. La TAP no es esencial para mantener la homeostasis de la vitamina E. Bajo condiciones *in vitro*, la vitamina E se une y activa al receptor nuclear X de los retinoides, involucrado en la regulación de genes para la detoxificación de drogas (Finno y Valberg, 2012). El exceso de α -tocoferol, así como en general de los tococromanoles, se metaboliza previo a su excreción, para mantener las concentraciones adecuadas del α -tocoferol (Zingg, 2007).

La barrera hematoencefálica (BHE). En un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica (BHE) se demostró que el receptor de la LDL se encuentra involucrado en una transcitosis transportadora de RRR- α -tocoferol, desde el torrente sanguíneo hasta el fluido cerebroespinal. Esto se ha demostrado en cerdos y ratones. Aunque haya pérdida del receptor de la LDL, no hay una disminución del RRR- α -tocoferol cerebral, por lo que esta vía parece no ser esencial para mantener la homeostasis de la vitamina E, pero participa en el mantenimiento de la homeostasis del α -tocoferol. Al parecer, no hay selectividad de los isómeros de la vitamina E para la BHE. Tanto la forma RRR- α -tocoferol como la γ -tocoferol se encuentran en el fluido cerebroespinal, lo que apunta a un solo sistema de transporte en la BHE para ambas formas químicas, que podría estar mediado por HDL más que por SR-B1. Los transportadores involucrados en distribuir el α -tocoferol dentro de las neuronas incluyen la apoproteína E, el LDLR y el SR-B1 (Finno y Valberg, 2012).

Metabolismo y Excreción

Si bien, no hay un órgano o tejido de almacenamiento de la vitamina E, las mayores concentraciones se cuantifican en los tejidos adiposo, hepático y muscular. La mayor parte del almacenamiento de la vitamina E incluye el tejido adiposo (90 %), hepático, muscular (Finno y Valberg, 2012), adrenal, cardíaco y los eritrocitos (Combs *et al.*, 1977; Zingg, 2007; Finno y Valberg, 2012). En el caso de estos últimos, Hidiroglou *et al.* (1992) mencionan que 20 % de la cantidad ingerida se destina a los hematíes. En un estudio en humanos, en el cual se utilizó la isoforma γ -tocoferol, se demostró que 31 % de la vitamina E se almacenó en el tejido adiposo; 38 %, en el músculo, y 53 %, en la piel (Saldeen y Saldeen, 2005). El metabolismo de la vitamina E está regulado por el sistema citocromo P₄₅₀ (CYP). Así, una suplementación importante con vitamina E incrementa el metabolismo de la misma por modulación del P₄₅₀.

El inicio del catabolismo de la vitamina E se lleva a cabo en el retículo endoplásmico, que resulta en la formación de una larga cadena de 13-hidroxicromanol por las enzimas CYP4F2 o CYP3A4. Estos metabolitos son tomados como ácidos grasos, pasan por la β -oxidación y se eliminan como propionil CoA y acetyl CoA, respectivamente (Galli *et al.*, 2017). Los conejos excretan el exceso de vitamina E por las heces y por lo menos 1 % de la ingesta total de vitamina E se excreta en la orina (Hidiroglou *et al.*, 1992). Después de la oxidación del tocoferol se genera α -tocoferil-quinona, que puede ser reducida por enzimas NADPH+H⁺ de los peroxisomas y de la mitocondria a α -tocoferol hidroquinona, misma que será excretada por los humanos en la orina, donde también se han identificado ácido tocoferónico y tocoferonolactona; además, se ha identificado al α -carboxietil hidroxicromano (α -CEHC), que es el único que conserva intacto el anillo de cromano (Galli *et al.*, 2017). Cada isómero de vitamina E tiene su propio metabolito, (α -, β -, γ - y δ -CEHCs). Antes de la excreción por la bilis o por la orina, la mayor parte de los CEHCs se conjugan enzimáticamente con la proteína asociada a la resistencia multidrogas (MRP2) o con la *p*-glicoprotein (MDR2). Así, se excretan, como muchas drogas, por el sistema de enzimas CYP.

INTERACCIÓN ENTRE SELENIO Y VITAMINA E

La deficiencia de uno o ambos micronutrientes incrementa el riesgo de posibles daños causados por el estrés oxidativo (Portier *et al.*, 2006; Wichtel *et al.*, 1997). Las manifestaciones clínicas más comunes de la deficiencia de la vitamina E y/o selenio son las enfermedades musculares y neuromusculares como: enfermedad del músculo blanco, enfermedad de la motoneurona equina y mioencefalopatía degenerativa equina (Löfstedt, 1997; Kirschvink, 2008). Además, las deficiencias se han asociado a la disminución en la efectividad del sistema inmune de los equinos (Knight y Tyznik, 1990; Arthur *et al.*, 2003). Sin embargo, se menciona que si la deficiencia es de uno de los micronutrientes, la actividad del otro puede compensar dicha deficiencia. Lo anterior puede ser un tanto arriesgado de afirmar, ya que los mecanismos y sitios de acción difieren, pues mientras la vitamina E está presente en la membrana celular y regenera los lípidos peroxidados, el Se se encuentra en el líquido intracelular y remueve RL (Huntington *et al.*, 1999). Entre otros problemas asociados a la deficiencia de Se y vitamina E se encuentran: la enfermedad de la grasa amarilla, la polimiositis y la distrofia muscular (Kirschvink *et al.*, 2008).

2.4.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante, actividad total antioxidante, capacidad total antioxidante o potencial total antioxidante de los individuos depende del balance pro-oxidante y antioxidante para controlar los procesos de oxidación que son inherentes a la vida. El común denominador de estos métodos es la reacción entre antioxidantes y radicales libres con base en la transferencia de electrones (métodos SET) o del átomo de hidrógeno (métodos HAT).

Entre los primeros métodos se pueden mencionar la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP, por sus siglas en inglés), también conocida como poder de reducción antioxidante del ión férrico (Ou *et al.*, 2002) y la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC). Las pruebas FRAP y TEAC utilizan al Trolox como estándar. El Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-

carboxílico) es un análogo de la vitamina E, soluble en agua. La TEAC es una medida de la fuerza antioxidante basada en el Trolox y se mide en equivalentes Trolox (ET), por ejemplo, $\mu\text{moles ET}/100\text{ g}$. La equivalencia al Trolox se utiliza en varios métodos (FRAP y otros más) como referencia para medir la capacidad total antioxidante de los vegetales, bebidas y suplementos alimenticios (Cuellar *et al.*, 2013).

Entre los métodos HAT están la capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) y el potencial de atrapamiento total del radical peróxido (TRAP, por sus siglas en inglés). El principio es utilizar un radical iniciador para generar el radical peróxido, ROO^{\bullet} , el cual atrae a un H^+ del antioxidante. Como resultado, la reacción entre el ROO^{\bullet} y la molécula blanco se retarda o inhibe (Ou *et al.*, 2002). La prueba ORAC solía usarse como una medición alternativa, pero en 2012 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) eliminó del sitio de internet del Laboratorio de datos de nutrientes, la base de datos ORAC de los alimentos por considerarlas biológicamente inválidas, argumentando que “(...) *Los datos sobre la capacidad antioxidante de los alimentos, generados por métodos in vitro (tubo de ensayo) no pueden extrapolarse a los efectos in vivo (humanos) (...). Ahora sabemos que las moléculas antioxidantes en los alimentos tienen un amplio rango de funciones, muchas de las cuales no están relacionadas con la habilidad de absorber radicales libres*” (USDA, 2016).

Dado que los métodos de cuantificación de la capacidad antioxidante se desarrollaron para aproximarse a la capacidad antioxidante de los alimentos y que utilizan diferentes RL u oxidantes por lo que generan resultados diferentes en una misma muestra, por lo que no se pueden comparar (USDA, 2016), es recomendable que si se van a utilizar para muestras de origen animal, se mida también un marcador del daño oxidativo (Costantini y Verhulst, 2009), tales como el MDA, isoprostanos, por mencionar algunos.

La formación de las EROs y ERNs son inherentes al metabolismo animal, sin embargo cuando se altera el balance entre los oxidantes generados y los antioxidantes disponibles, a favor de los primeros, se presenta el estrés oxidativo. La alimentación dependiendo de su composición puede contrarrestar o favorecer el estrés oxidativo. Por ejemplo, en humanos una dieta estilo occidental: alta en grasa, pero, baja en calcio y vitamina D incrementa el riesgo de cáncer colorectal (Erdelyi *et al.*, 2009); mientras que la dieta Mediterránea caracterizada por incluir aceite de oliva como fuente de grasa; un elevado consumo de vegetales, fruta, cereales, leguminosas, frutos secos; bajo consumo de lácteos, pescado, pollo, carne roja, huevo y vino, reduce el estrés oxidativo y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Dai *et al.*, 2008). En el caso de los equinos, una alimentación en libertad, dependiendo de las especies forrajeras disponibles, les proporciona la oportunidad de tener una dieta con diferentes especies vegetales mejorando el espectro nutrimental en cantidad, diversidad y disponibilidad, en comparación con una dieta en confinamiento donde se ofrecen una o máximo dos especies forrajeras deshidratadas o en ensilado y concentrados ricos en energía que predisponen a desarrollar sobrepeso y obesidad. En cuanto al aprvisionamiento de complementos vitamínicos y minerales no es una práctica generalizada. Por lo anterior, es importante revisar tipo, dosis y fuentes de antioxidantes que mejoren el estado de antioxidantes de esta especie susceptible a padecer estrés oxidativo y patologías diversas asociadas al mismo.

2.5 JUSTIFICACIÓN

La disponibilidad de O₂ disminuye en forma inversa a la altitud, lo que, en conjunto con la realización de ejercicio físico, genera en los individuos mayor estrés oxidativo. Esto puede debilitar al sistema antioxidante, tanto enzimático como no enzimático. Schmidt *et al.* (2002) utilizaron en caballos una mezcla de antioxidantes, que contenía vitamina E, Se, β-caroteno, ácido ascórbico, ácido α-lipoico y N-acetil L-cisteína, y lograron disminuir el estrés oxidativo provocado por la altitud y la falta de O₂; más aún, una complementación sólo con vitamina E disminuyó significativamente la peroxidación lipídica (Ilavazhagan *et al.*, 2001).

A 2240 m de altitud, donde se encuentra la CDMX, la disponibilidad de O₂ disminuye 25 % con respecto a la observada a nivel del mar, con una presión barométrica de 580 mm de Hg (Frisancho, 1975). Esto provoca hipoxia en los caballos, que deben inspirar más aire para obtener el O₂ necesario para sus procesos oxidativos y la generación de energía y, así, evitar la fatiga muscular. Además, en la CDMX el aire contiene concentraciones importantes de los contaminantes criterio (ozono, bióxido de nitrógeno, monóxido de carbono, bióxido de azufre y material particulado menor a 10 µm de diámetro; SIMAT, GDF 2013), lo que disminuye aún más la disponibilidad de O₂.

En este trabajo se proporcionó oralmente Se y vitamina E a caballos que habitan en la CDMX y que realizan trabajo físico moderado para estudiar su efecto en indicadores bioquímicos relacionados con la condición antioxidante (GPx y SOD), oxidante (MDA) y en las enzimas asociadas al daño muscular (CK, LDH y AST). Esta información se complementó con mediciones de cortisol plasmático, como indicador de estrés, así como de Se, Cu y Zn en sangre completa. Los datos generados permitirán evaluar las respuestas de caballos sometidos a ejercicio físico moderado en condiciones de altitud elevada a una complementación con diferentes dosis de antioxidantes.

2.6 HIPÓTESIS

En equinos sometidos a ejercicio moderado, la complementación con Se y vitamina E en función de las dosis utilizadas de ambos suplementos, tendrán los siguientes efectos:

Incrementará...	Disminuirá...
...las concentraciones sanguíneas de selenio (Se)	...las concentraciones séricas de cortisol (COR), hormona indicadora del estrés.
...las concentraciones séricas de α -tocoferol (α -TOC)	...las concentraciones séricas de malondialdehído (MDA), un indicador de peroxidación lipídica.
...la actividad de la enzima intraeritrocitaria antioxidante, Glutación Peroxidasa (GPx).	...la actividad de la creatina quinasa (CK), enzima sérica indicadora de daño muscular
	...la actividad de la aspartato aminotransferasa (AST), enzima sérica indicadora de daño muscular
	...la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH), enzima sérica indicadora de daño muscular
	...la actividad de la enzima intraeritrocitaria antioxidante, superóxido dismutasa (SOD).
	...las concentraciones sanguíneas de cobre (Cu)
	...las concentraciones sanguíneas de zinc (Zn)

2.7 OBJETIVO

Evaluar las respuestas de analitos sanguíneos de caballos sometidos a ejercicio físico moderado en condiciones de altitud elevada a una complementación con diferentes dosis de vitamina E y Se.

2.7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Medir el efecto de la doble complementación con dos niveles de Se y dos niveles de vitamina E en las concentraciones de:

- ❖ Cortisol
- ❖ Marcadores de estrés oxidativo: MDA
- ❖ Enzimas relacionadas con el daño muscular: CK, AST y LDH
- ❖ Enzimas con actividad antioxidante: SOD y GPx
- ❖ α -tocoferol (suero) y Se, Zn y Cu (sangre), por ser elementos relacionados con estado antioxidante del animal

3 MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental de esta investigación fue aprobado por el Subcomité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, CDMX.

3.1 LUGAR

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Policía Metropolitana Montada del Gobierno del Distrito Federal (UPMM-CDMX); el agrupamiento se encuentra ubicado al oriente de la Ciudad de México en Cabeza de Juárez, Delegación Iztapalapa. Coordenadas: 19°21'30''N y 99°05'35''W, a una altitud de 2240 m. Esta zona presenta un clima templado subhúmedo, con régimen de lluvias en verano. La temperatura anual promedio es de 17.7°C y la precipitación promedio anual es de 615.6 mm. Durante los días experimentales, la temperatura y precipitación pluvial medias fueron de 16.8°C y 8.63 mm, respectivamente.

3.2 ANIMALES, ALOJAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se revisaron los registros del agrupamiento para seleccionar 24 caballos (unidades experimentales, UE) en servicio activo, que no se movilizaran de forma constante fuera de las instalaciones de la UPMM. Una vez seleccionados, se realizó un examen físico para constatar que las UE estuvieran clínicamente sanas, con buena salud de cascos, bien herrados, sin problemas de claudicación. Se prefirieron los caballos que no se ejercitaron intensamente un mes previo al inicio del desarrollo de la fase experimental. Los caballos se alojaron individualmente en caballerizas (5 × 5 m) con piso de concreto, con un área suave, cama de paja de avena, paredes lisas y bebederos de pileta, con una buena ventilación. Las caballerizas permitían el contacto visual entre los caballos.

Los animales utilizados fueron de razas de sangre caliente, con una edad entre 5 a 13 años y 450.38 ± 9.77 kg. Se desparasitaron con una mezcla de moxidectina y prazicuantel (0.4 y

2.5 mg/kg PV, respectivamente) y se asignaron de forma aleatoria a uno de los cuatro grupos experimentales, cada uno con 6 individuos (6 repeticiones por tratamiento). Los grupos experimentales se conformaron en un arreglo factorial balanceado 2×2 , con dos niveles de Se (**LSe**, 0.1, y **HSe**, 0.3 mg/kg de MS) y dos de vitamina E (**LE**, 1.6, y **HE**, 2 UI/kg de PV) (cuadro 11). Estas cantidades son las recomendadas en el NRC (2007). Los tratamientos se plantearon teniendo como base un control positivo (LSeLE), consistente en aportar las cantidades de Se (0.1 mg/kg MS) y vitamina E (1.6 UI/kg PV) indicadas para caballos que realizan actividad física moderada. El peso se estimó semanalmente con una cinta para pesar (Equimax Strategy Tape, Virbac Lab).

Id	Grupo Experimental	Dieta basal +	
		Selenio (mg/kg)	Vitamina E (UI/kg PV)
LSeLE	bajo en Se y bajo en vitamina E	0.1	1.6
HSeLE	alto en selenio y bajo en vitamina E	0.3	1.6
LSeHE	bajo en Se y alto en vitamina E	0.1	2.0
HSeHE	alto en Se y alto en vitamina E	0.3	2.0

El trabajo tuvo una duración de 77 días, que se distribuyeron de la siguiente forma: Periodo 1 (P1), 28 días de adaptación (día 0 – 28) relativo al ajuste de la alimentación y al manejo; P2, 28 días de ejercicio moderado (día 29 – 56); P3, descanso y retiro de la doble complementación antioxidante (día 57 – 63), y P4 de readaptación a las condiciones de alimentación y manejo de la UPMM (días 64 – 77) (figura 3.1).

Días de experimentación			
P1, 0 – 28	P2, 29 – 56	P3, 57 – 63	P4, 64 – 77
			
ADAPTACIÓN	EJERCICIO MODERADO	DESCANSO	READAPTACIÓN

Figura 3.1 Distribución de los diferentes periodos en que se mostraron los días experimentales y su duración en días (P = periodo).

3.3 ALIMENTOS Y ALIMENTACIÓN

La UPMM adquiere cada seis meses el alimento de los caballos; por ello, se tomaron muestras de los ingredientes de la dieta al inicio del experimento y cuando se realizaron cambios en el periodo experimental (figura 3.1). Al principio, y en respuesta a las solicitudes de la corporación policiaca, se mantuvo la sobrealimentación cotidiana; sin embargo, a los 17 días de iniciado el estudio, se presentaron dos casos de cólico y uno con principios de laminitis, por lo que se ajustaron las cantidades proporcionadas. Así, a partir del día 18, los caballos se alimentaron respetando el horario de distribución cotidiana (0500, 0700, 1400 y 1600 h) de la UPMM. La ración estuvo constituida por: 5.38, 2.09 y 1.83 kg de MS de heno de avena, heno de alfalfa y concentrado. En los horarios mencionados se distribuyó 0.125, 0.250, 0.250 y 0.375 del total de la ración, respectivamente.

Todos los caballos recibieron la misma dieta, la única diferencia entre los tratamientos fue el nivel de suplementación. La suplementación se proporcionó como seleno levadura², (2.052 g/kg MS) y acetato de α -tocoferilo³, (0.439 mg/kg MS). Para su administración individual diaria, los suplementos se pesaron y conservaron en tubos de polipropileno protegidos de la luz. Los suplementos se mezclaron con el concentrado ofrecido por la mañana (0500 h).

² Seleno Source AF2000. Diamond V.

³ Rovimix E-50 adsorbate. DSM, México.

Con el fin de enmascarar el sabor amargo de la levadura fue necesario añadir 20 mL de miel sabor maple. La doble suplementación se suspendió al día 63 (figura 3.1).

3.4 COLECCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y EJERCICIO FÍSICO

Antes de iniciar el experimento (0d), se tomaron en tubos Vacutainer®⁴, 10 mL de sangre de la vena yugular: dos tubos con heparina para la cuantificación de cortisol, MDA, vitamina E, CK, AST y LDH, y otros dos sin anticoagulante para cuantificar Se, SOD, GPx, Cu y Zn. Para evitar el efecto circadiano del cortisol, las muestras sanguíneas se obtuvieron entre las 1100 y 1300 h. La colección de sangre se repitió cada semana por 11 veces más. Para disminuir el efecto del estrés, los caballos se manejaron con un sistema de premios después del sangrado.

Los tubos con las muestras se transportaron de inmediato a la FMVZ-UNAM. Una muestra en tubo con anticoagulante y otra sin anticoagulante se llevaron al servicio de Bioquímica Clínica del laboratorio de Patología de la FMVZ para la cuantificación de las enzimas indicadoras de daño muscular y de la acción enzimática antioxidante. Los otros dos tubos se llevaron al laboratorio de Toxicología del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (DNAB, FMVZ).

Durante las 4 semanas del P2, los caballos realizaron actividad física bajo un esquema semanal de tres días de ejercicio moderado y cuatro de descanso. De esta forma, el ejercicio desafió la condición física de los caballos, que se ejercitaron en una pista de salto de aproximadamente 20 × 60 m, durante 30 minutos, bajo un esquema 05:20:05 min de caminata de calentamiento, semigalope y caminata de enfriamiento, respectivamente (O'Connor *et al.*, 2004; Pfau *et al.*, 2006). Durante los tres días de ejercicio (con estetoscopio), se registró la frecuencia cardíaca antes y después del ejercicio (cuadro 3.1).

⁴ Becton Dickinson, Vacutainer,

Durante el P2, la muestra semanal de sangre se tomó 5 minutos después de haber finalizado el ejercicio físico al tercer día de cada semana, en el horario ya mencionado.

Cuadro 3.1 Frecuencia cardiaca en caballos. (*A partir de Pagan; 1988; Kentucky Equine Research, Inc., Versailles, US*)

Frecuencia cardiaca (lpm ¹)	Valor
Mayor 2 años	30 – 50
Trote moderado	80 – 180
Galope	220 – 240

¹ lpm, latidos por minuto

3.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.5.1 ANÁLISIS DE LABORATORIO

INGREDIENTES

La evaluación de la composición química de la dieta (cuadro 3.2) se realizó en los laboratorios del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica (FMVZ-UNAM), de acuerdo con la metodología oficial (AOAC, 2000): humedad (gravimetría; 950.46); proteína cruda (Kjeldahl; 988.05); fibra detergente neutro, FDN (2002.04); fibra detergente ácido, FDA (973.18); Ca (AAS, 968.08); Cu (AAS, 975.03); Zn (AAS, 975.03) y P (fotometría, 965.17). El Se de la dieta se cuantificó por generación de hidruros acoplada a absorción atómica (AOAC, 996.17; Perkin Elmer MHS10 – Perkin Elmer 2380; Champaign, IL. US), con flama aire – acetileno. El límite de detección del equipo fue de 2.0 ng/g. Los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron menores a 5 %. La vitamina E se cuantificó (NFIA, 1991) por HPLC (Waters 600E; Milford, MA. US) con un detector fluorimétrico; el límite de detección fue de 1 µg/g; los CV intra – e inter-ensayo fueron menores a 3 %. La energía digestible fue calculada con la fórmula de Pagan (1998).

Cuadro 3.2 Ingredientes de la dieta y valor nutrimental de la dieta utilizada para caballos policía (450 kg PV)

Ingredientes	
Heno de avena (g/kg MS)	611.50
Heno de alfalfa (g/kg MS)	195.40
Concentrado (g/kg MS)	193.10
Composición química	
Materia orgánica, OM (g/kg MS)	926.78
Proteína cruda, PC ($N \times 6.25$, g/kg MS)	100.12
Extracto etéreo, EE (g/kg MS)	38.20
Fibra detergente neutro, FDN (g/kg MS)	495.75
Fibra detergente ácido, FDA (g/kg MS)	353.21
Cenizas (g/kg MS)	73.22
Ca total (g/kg MS)	4.93
P total (g/kg MS)	3.39
Cu (mg/kg MS)	48.77
Zn (mg/kg MS)	6.86
Se (mg/kg MS)	ND
Vitamina E (UI/kg MS)	13.74
ED (Mcal/kg MS)*	2.291

ND, no detectable a < 2 ng/kg

ED, Energía digestible calculada. ED (kcal/kg MS) = $2.118 + 12.18(\%PC) - 9.37(\%FDA) - 3.833(\%Hem) + 47.18(\%grasa) + 20.5(\%CNE) - 26.3(\%Cen)$.

$CNE = 100 - (\%FDN) - (\%grasa) - (\%Cen) - (\%PC)$; (Pagan, 1998).

SANGRE Y SUERO

En el servicio de Bioquímica Clínica del laboratorio de Patología (FMVZ-UNAM) se cuantificaron de manera casi inmediata las actividades de las enzimas séricas relacionadas con el daño muscular (CK, AST y LDH). En tanto, en la fracción eritrocitaria se cuantificaron las actividades correspondientes a las enzimas antioxidantes SOD y GPx. La cuantificación se realizó por espectrofotometría, utilizando kits comerciales⁵ (RANDOX Laboratories Ltd, UK., RANDOX Daytona, Serie: 5826-0031) y siguiendo las especificaciones del fabricante (cuadro 3.3).

Cuadro 3.3 Productos utilizados para la cuantificación de la actividad enzimática en suero y sangre

Enzimas	Producto ⁵
<i>Indicadoras de daño muscular</i>	
Creatina quinasa, CK	CK-NAC Activado
Aspartato aminotransferasa, AST	GOT/ASAT
Lactato deshidrogenasa, LDH	LDH opt. (LDH P-L)
<i>Antioxidantes</i>	
Superóxido dismutasa, SOD	RANSOD
Glutación peroxidasa, GPx	RANSEL

Las muestras sanguíneas sin anticoagulante remitidas al DNAB se centrifugaron (1600 g × 10 min, a 4°C); el suero se colocó en cuatro tubos de polipropileno y se conservaron a -20 °C hasta su ulterior análisis. En estas muestras se cuantificaron el MDA

⁵ RANDOX CE Reino Unido

(Gutteridge, 1975) y la vitamina E por HPLC (Waters 600E; Milford, MA. US). En las muestras de sangre completa se cuantificaron: Cu (AAS, 975.03); Zn (AAS, 975.03) y Se (AOAC, 996.17; generación de hidruros acoplada a absorción atómica; Perkin Elmer MHS10 – Perkin Elmer 2380; Champaign, IL. US), con flama aire – acetileno.

En el Laboratorio de Reproducción del Departamento del mismo nombre (FMVZ-UNAM), y con la finalidad de tener un parámetro sobre el posible estrés al que pudieron estar sometidos los caballos, se cuantificó el cortisol sérico por la técnica de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), utilizando un kit comercial (11-CORHU-E01, ALPCO Diagnostics; Salem NH, US. BioTek Epoch. BioTek Instruments, Vermont, USA) y apegándose a las indicaciones del fabricante. El límite de detección del kit fue de 50 ng/mL; el CV intra- and inter-ensayo fue <10 %.

3.5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de MDA, de las enzimas CK, AST, LDH, SOD y GPx y de la vitamina E, Se, Cu y Zn se analizaron utilizando un modelo mixto (PROC MIXED, SAS versión 9.1. 2, 2004) para un arreglo factorial balanceado 2×2 (2 niveles de Se \times 2 niveles de vitamina E), con mediciones repetidas a través del tiempo. El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + C_{k(ij)} + Y_t + (\alpha Y)_{it} + (\beta Y)_{jt} + (\alpha\beta Y)_{ijt} + \varepsilon_{ijkl}$$

Dónde:

Y_{ijkl} ,	valor observado en el tiempo t en el k -ésimo caballo asignado al i -ésimo nivel de Se y el j -ésimo nivel de E
μ ,	efecto de la media
α_i ,	efecto del i -ésimo nivel de Se, $1 \leq i \leq 2$
β_j ,	efecto del j -ésimo nivel de E, $1 \leq j \leq 2$
$(\alpha\beta)_{ij}$,	efecto de la interacción del i -ésimo nivel de Se y el j -ésimo nivel de E
$C_{k(ij)}$,	efecto aleatorio del k -ésimo caballo i -ésimo nivel de Se y el j -ésimo nivel de E ($1 \leq i \leq 2$; $1 \leq j \leq 2$)
Y_t ,	efecto del t -ésimo día, cuando la medición fue tomada
αY_{it}	efecto de la interacción del i -ésimo nivel de Se y el t -ésimo día
βY_{jt}	efecto de la interacción del j -ésimo nivel de E y el t -ésimo día
$(\alpha\beta Y)_{ijt}$,	efecto de interacción entre el i -ésimo nivel de Se y el j -ésimo nivel de E y el t -ésimo día
ε_{ijkl} ,	error experimental aleatorio asociado con el k -ésimo caballo asignado al i -ésimo tratamiento del factor A y el j -ésimo nivel del factor B en el tiempo t

Los resultados de la frecuencia cardiaca se analizaron bajo el mismo modelo, incluyendo como efecto fijo la realización de ejercicio. Las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba de Tukey-Kramer. Para explorar las relaciones probables entre las variables de respuesta, se realizó un análisis de correlaciones (Coeficiente de Pearson). Considerando la no independencia de los datos, se realizaron análisis de regresión entre las variables por día experimental. La significancia se consideró a $P < 0.05$ y la tendencia a $P < 0.1$.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis estadísticos para las diferentes variables en estudio se presentan en el Capítulo 8 correspondiente a los Anexos.

Con la finalidad de facilitar su presentación, los resultados se han organizado en los siguientes apartados:

- ❖ Peso vivo (PV)
- ❖ Cortisol y malondialdehído (COR y MDA)
- ❖ Selenio y vitamina E (α -TOC)
- ❖ Enzimas asociadas con el daño muscular (CK, AST y LDH)
- ❖ Enzimas del sistema antioxidante (GPx y SOD)
- ❖ Metales asociados al sistema antioxidante (Zn y Cu)

Por otra parte, sólo se discuten los resultados de las correlaciones significativas entre las variables de respuesta en determinado periodo experimental.

Es importante señalar que para esta sección se utiliza “E” como la abreviatura para identificar la fuente dietaria de vitamina E y “ α -TOC” para designar al α -tocoferol del suero sanguíneo.

4.1 PESO VIVO

El peso estimado al día cero (d 0) se mantuvo sin cambios ($P > 0.05$) hasta el d 7; por esta razón, se utilizó esta última observación como peso inicial para realizar el análisis estadístico. Sólo el día experimental afectó ($P < 0.001$) el peso de los caballos durante todo el estudio (figura 4.1). Así, del d 7 al 28 el peso se mantuvo prácticamente constante ($455.0 \text{ kg} \pm 3.8 \text{ EEM}$); en el d 35 se registró una pérdida de peso de 4.1 % respecto del periodo de adaptación, lo que correspondió a los valores más bajos ($P < 0.001$,

436.50 kg \pm 8.39 EEM) de todo el estudio. Del d 42 al 77, los animales recuperaron su peso (P <0.05; 451 kg \pm 8.4 SEM) a un valor similar al observado en el d 7.

Como se mencionó, durante el periodo de adaptación (d 0 – 28) el peso de los caballos se mantuvo sin variaciones, lo que se atribuye al manejo realizado, ya que permanecieron confinados sin realizar una actividad física importante. Además, se alimentaron con una dieta formulada para caballos de 450 kg con actividad física moderada (NRC, 2007), por lo que no se esperaban cambios en el peso. Sin embargo, se registró una pérdida de peso de 4.1 %, al d 35, que se atribuyó a una pérdida de agua corporal, ya que la realización de trabajo físico desencadena cambios en el animal, siendo el más importante, la sudoración, cuyo incremento está en función de la duración e intensidad de la actividad y puede representar hasta 92 % del peso perdido bajo estas circunstancias (Hodgson *et al.*, 1993). Friend (2000) observó en 30 caballos (hembras y machos castrados) una pérdida de peso desde 17 hasta 50 kg simplemente por fatiga y deshidratación al ser transportados por 30 horas en condiciones de temperatura cálida. Se ha demostrado (Szlyk *et al.*, 1989) que los humanos en pruebas de resistencia (endurance) pueden perder de 0.80 a 2.53 % de su peso por la sudoración. Kinstone *et al.* (1997) mencionan que, en los caballos, la merma de peso provocada por el ejercicio prolongado se debe principalmente a la sudoración. Así, los caballos participantes en una competencia de endurance de 80.46 y 160.93 km perdieron entre 3.6 y 5.7 % de su peso vivo, respectivamente, que no se recuperó durante el descanso nocturno (Schott *et al.*, 1997).

En los equinos, la disminución en el volumen de líquidos puede ir desde menos de 6 L/d bajo condiciones de termoneutralidad (5 – 20°C de temperatura ambiente) y de inactividad (Hodgson *et al.*, 1993) hasta 15 L/h en animales ejercitándose (Fielding *et al.*, 2009). En el presente estudio, la pérdida de peso observada al d 35 después de la realización del ejercicio no causó signología clínica de deshidratación. Esta pérdida de peso se revirtió en sólo 7 días (d 42), sin modificación de la dieta, lo que permite sostener que la pérdida cuantificada fue principalmente de fluidos. El mantenimiento del peso corporal a partir del d 42 puede explicarse por el acondicionamiento de los animales a la actividad física y a su

suspensión a partir del d 56. Si bien la aclimatación completa toma 21 d, la mayor parte del ajuste tiene lugar entre los d 10 a 14 (NRC, 2007), lo que permitió cuantificar la rápida recuperación del peso vivo, de hasta el 99.12 % de lo registrado en P1.

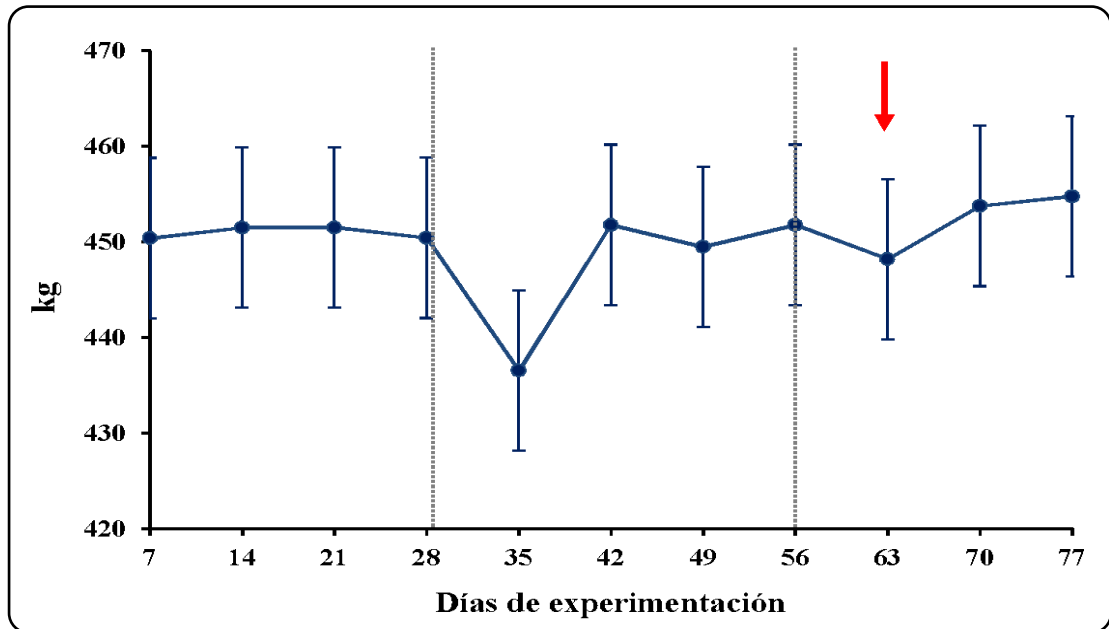


Figura 4.1 Peso vivo (kg) promedio de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura; 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α tocoferol; 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

4.2 CORTISOL Y MALONDIALDEHÍDO

4.2.1 CORTISOL: LA HORMONA CON FUNCIONES PSICOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS Y FÍSICAS

La concentración sérica de COR se vio afectada ($P = 0.024$) por el nivel de complementación con Se ($P = 0.024$) y los días de experimentación ($P < 0.001$) (cuadro 4.1).

La concentración promedio de cortisol de los tratamientos altos en Se (HSe, 304.01 ng/mL \pm 39.03 EEM); la concentración promedio de COR del grupo HSe fue 1.8 veces mayor que la de los tratamientos bajos en Se (LSe, 168.90 ng/mL \pm 39.03 EEM). Este resultado, contrasta con lo concluido por Fonseca *et al.* (2016), quienes observaron que la doble complementación con Se y E por 30 días contribuyó a disminuir el cortisol y el lactato después de la realización del ejercicio, sugiriendo una mejoría en la utilización de la energía.

La relación entre Se y cortisol está muy pobremente documentada; sin embargo, se han reportado algunos resultados en roedores (Abarikwu *et al.*, 2013; Chattopadhyay *et al.*, 2003; Bekheet, 2011) y en la trucha arcoiris (Wiseman *et al.*, 2011). El efecto del Se en las concentraciones de COR sérico podría explicarse por su acción en la síntesis de las hormonas esteroides. Por ejemplo, el uso de 15 μ g/mL de Se en el agua de bebida en ratas intoxicadas con cadmio (Cd) contrarrestó el efecto tóxico del Cd en los testículos; esto se reflejó en la actividad enzimática de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Cd, 0.78 vs Cd + Se, 2.92 U/L/mg proteína) y de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Cd, 0.70 vs Cd + Se, 3.30 U/L/mg proteína), así como en las concentraciones plasmáticas de testosterona (Cd, 4.7 μ g/L vs Cd + Se, 8.4 μ g/L). Las dos enzimas son comunes para la síntesis de hormonas esteroides. Otro estudio (Chattopadhyay *et al.*, 2003), realizado también en ratas, mostró que la administración diaria de 0.6 μ g/g de selenito de sodio junto con 0.4 μ g/g de arsenito de sodio por cuatro semanas fueron suficientes para contrarrestar la toxicidad por arsénico y restablecer la actividad normal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, así como la esteroidogénesis. El efecto del Se en la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) ha sido reportado en las gónadas de machos (Abarikwu *et al.*, 2013) y hembras (Chattopadhyay *et al.*, 2003), pero se requiere mayor investigación sobre el efecto del Se en la 3 β HSD de las glándulas adrenales. En el caso de la trucha arcoiris, la exposición crónica a la Se-Met incrementó las proteínas asociadas con la síntesis de enzimas relacionadas con la esteroidogénesis (Wiseman *et al.*, 2011). Este resultado podría explicar el efecto del Se en las concentraciones séricas de cortisol de los caballos en este estudio, ya que la fuente administrada fue de naturaleza orgánica (Se-Met).

Cuadro 4.1 Concentraciones séricas de cortisol (ng/mL) y de malondialdehído (MDA; nmol/mL) en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con selenio (seleno-levadura) y vitamina E (DL- α -tocoferol)

Analito	Medias Mínimo Cuadráticas				EEM	Valor de P						
	LSeLE ¹ (n = 6)	HSeLE ² (n = 6)	LSeHE ³ (n = 6)	HSeHE ⁴ (n = 6)		Se	E	Se × E	d	d × Se	d × E	d × Se × E
Cortisol	162.43 ^b	383.49 ^a	175.36 ^b	224.52 ^a	55.19	0.024	0.201	0.135	<0.001	0.394	0.274	0.776
MDA	0.84	0.87	0.85	0.89	0.04	0.716	0.450	0.928	<0.001	0.958	0.712	0.993

^{a, b} Literales diferentes en la misma línea indican diferencia estadística (P < 0.05)

¹LSeLE, 0.1 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

²HSeLE, 0.3 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

³LSeHE, 0.1 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

⁴HSeHE, 0.3 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

EEM, error estándar de la media

d, día

El día experimental también afectó las concentraciones séricas de la hormona, como puede observarse en la figura 4.2. La concentración promedio del d 0 a 35 (periodo de adaptación) fue de $199.30 \text{ ng/mL} \pm 12.80 \text{ EEM}$. Durante el periodo de ejercicio moderado, la concentración de cortisol claramente aumentó, alcanzando su pico el d 42 ($345.95 \text{ ng/mL} \pm 46.8 \text{ EEM}$), aunque el CV observado ese día fue elevado (66.3 %). Hacia el final de P3, el cortisol sérico disminuyó a $204.15 \text{ ng/mL} \pm 69.96 \text{ EEM}$ al d 63 y a $220.90 \text{ ng/mL} \pm 26.10 \text{ EEM}$ en P4, durante la readaptación al manejo de la UPMM. Estos valores no fueron diferentes de ($P > 0.05$) los observados durante P1.

Si bien, la secreción circadiana de cortisol en el caballo se altera fácilmente por factores estresantes, tales como el estrés físico y el medio ambiente (Cordero *et al.*, 2012), su rango normal de referencia va de 200 a 600 ng/mL. Tanto en animales en descanso como en aquéllos que realizan trabajo físico, las mayores concentraciones séricas de cortisol se cuantifican entre las 0600 y 0800 h y las menores, entre las 2300 y 0400 h (Fejsáková *et al.*, 2014). En este estudio se evitó el efecto circadiano de la secreción de cortisol al tomar las muestras sanguíneas entre las 1100 y 1300 h. Aún así, las concentraciones de COR durante todo el periodo experimental (descanso y ejercicio físico) fueron mayores a las obtenidas en caballos en pastoreo (67.31 – 101.49 ng/mL, acrofase entre 0600 y 0900 h; Irvine y Alexander, 1994), en caballos con problemas músculo esqueléticos (49.70 – 88.66 ng/mL, acrofase entre 0900 y 1100 h; Ayala *et al.*, 2012), o en animales con síndrome abdominal agudo (20.8 – 66.18 ng/mL) o con disfunción de la *pars intermedia* de la pituitaria (92.12 ng/mL; Beech *et al.*, 2011).

Las elevadas concentraciones de COR vistas en este estudio apoyan lo observado por Irvine y Alexander (1994) y Leal *et al.* (2011), quienes reportan que los caballos confinados presentan alteraciones en las concentraciones de cortisol y su ritmo circadiano; además, el trabajo y las condiciones de alojamiento de los caballos de la policía pueden generar estrés crónico (Leal *et al.*, 2011). Aunque, el cortisol sérico permaneció elevado durante los 77 días experimentales, las concentraciones aumentaron aún más durante P2, lo que explica el efecto observado del día de experimentación. Así, las concentraciones de COR encontradas

durante los periodos de inactividad física estuvieron dentro de lo reportado por algunos autores en esos casos, con un rango que va de 39.87 (Medica *et al.*, 2010) hasta 740 ng/mL (Tadich *et al.*, 2013).

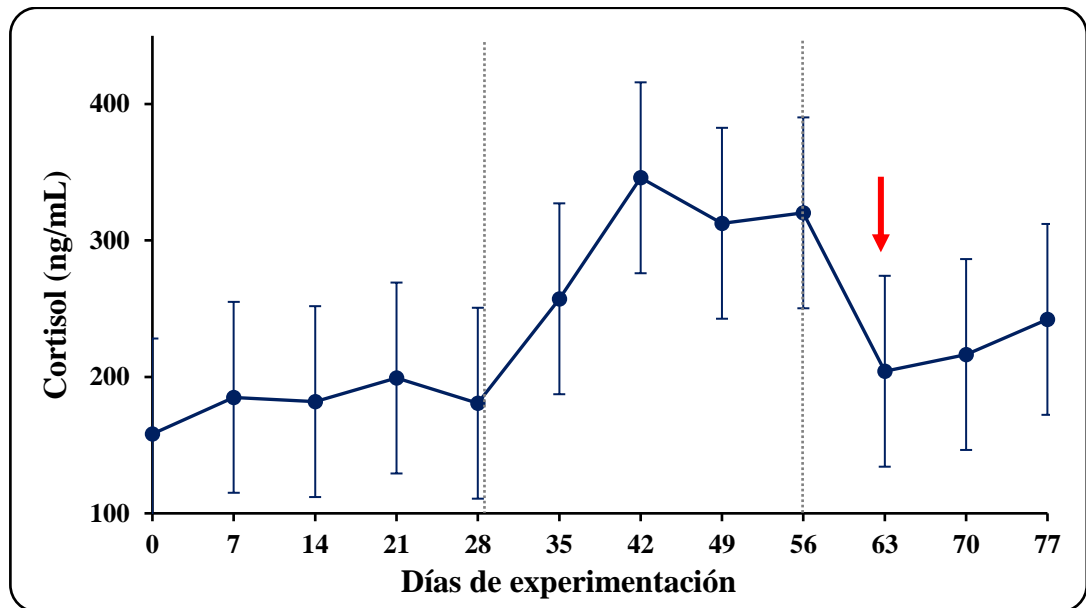


Figura 4.2 Concentraciones promedio de cortisol en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α tocoferol; 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

El ejercicio es un factor de estrés agudo (Snow y Rose, 1981, Robson *et al.*, 2003) y el cortisol tiene un efecto en el metabolismo de la energía (Cuff *et al.*, 2005) para mantener los niveles de actividad. En atletas humanos se ha observado que las concentraciones séricas de la hormona aumentan durante el ejercicio aún cuando haya consumo de antioxidantes. En un estudio, las concentraciones séricas de COR del grupo control

negativo fueron de 60.50 ± 12.65 ng/mL y para el grupo que recibió los antioxidantes (α -tocoferol, vitamina C y β -caroteno) fueron de 77.17 ± 18.98 ng/mL; al término de la actividad física, el primer grupo elevó sus concentraciones a 68.11 ± 27.22 ng/mL y el grupo con antioxidantes las incrementó a 86.95 ± 30.06 ng/mL (Teixeira *et al.*, 2009). Algunos autores como Malinowski *et al.* (2006) mencionan que no hay una notable diferencia en relación con la intensidad de la actividad o con la edad de los animales. Otros investigadores (Jiménez *et al.*, 1998) han determinado que la concentración de COR está relacionada con la duración del ejercicio. Teniendo en cuenta la secreción circadiana de COR, sus concentraciones séricas en equinos de la raza Warmblood bajo ejercicio intenso fluctúan entre 19.90 ng/mL en caballos ejercitados hasta la fatiga en unos minutos (Malinowski *et al.*, 2006) y 243.63 ng/mL en equinos sujetos a ejercicio de dos velocidades (Lindner *et al.*, 2000).

Por otro lado, la información del efecto del ejercicio físico moderado en las concentraciones de COR es limitada y variable: 70.84 a 93.90 ng/mL (CV, 14 %; Cuff *et al.*, 2005); 46.90 a 91.68 ng/mL (CV, 32.3 %; Linden *et al.*, 1991) después de 2.97 min de trote a una velocidad promedio de 740.80 m/min. Los resultados de lactato (ver más adelante) y cortisol en este estudio apuntan a que la secreción del COR dependió más de la duración de la actividad que de su intensidad, como Nagata *et al.* (1999) observaron. Al día 63, una semana después del término de la actividad física y a la suspensión de la complementación, la concentración de la hormona descendió a los niveles observados previos al ejercicio físico.

Por otra parte, la altitud de la CDMX también juega un papel importante en las concentraciones de la hormona. Caballos que fueron acondicionados por tres semanas y después movilizados de 250 a 3800 m.s.n.m. mostraron un incremento (de 45.75 a 60.75 ng/mL) en el cortisol sérico de animales sin actividad física que permaneció elevado durante 96 h a los 3800 m.s.n.m. El COR recuperó los niveles (49.87 a 66.00 ng/mL) similares a los observados a 250 m de altitud. Sin embargo, el COR en los animales activos aumentó y permaneció así (58.5 ng/mL) incluso después de las 96 h a 3800 m de altitud

(Greene *et al.*, 2002). De esta forma, altitudes más allá de los 200 m y la actividad física favorecerían la elevación y mantenimiento de las concentraciones séricas de COR. El efecto de la altitud también ha sido consignado en humanos (Sawhney *et al.*, 1991).

4.2.2 MALONDIALDEHÍDO (MDA)

Las concentraciones séricas de MDA fueron afectadas ($P < 0.001$) únicamente por el día de experimentación (cuadro 4.1), su comportamiento a través del tiempo se observa en la figura 4.3.

La concentración inicial (d 0) de estos marcadores de LPO fue de $0.59 \text{ nmol/L} \pm 0.06 \text{ EEM}$; la cual incrementó ($P < 0.05$) 3.03 veces al día 7, cuando alcanzó $1.79 \text{ nmol/mL} \pm 0.09 \text{ EEM}$, para descender ($P < 0.05$) nuevamente en d 14. Se asume que del día 14 al 35 no hubo variaciones importantes ($P > 0.05$; $0.67 \text{ nmol/mL} \pm 0.019 \text{ EEM}$). Sin embargo, al día 42 se observó una segunda elevación ($P < 0.05$; $1.25 \text{ nmol/mL} \pm 0.09 \text{ EEM}$) lo que representó el 0.70 de lo observado en d 7. El MDA sérico descendió nuevamente ($0.53 \text{ nmol/mL} \pm 0.06 \text{ EEM}$), así en d 63 encontramos un valor no diferente ($P > 0.05$) del valor basal. Al final del periodo experimental, el MDA se incrementó de nuevo (d 77, $1.00 \text{ nmol/mL} \pm 0.06 \text{ EEM}$); sin embargo, no fue diferente ($P < 0.05$) de las concentraciones de d 42. En caballos se ha reportado un amplio rango de valores de sustancias reactivas al ácido barbitúrico (MDA) en suero proveniente de caballos bajo diferentes condiciones (cuadro 4.2).

Las concentraciones de TBARS en las fracciones sanguíneas y en otros tejidos se han utilizado como indicadores de la peroxidación lipídica, y del daño oxidativo (Lykkesfeldt y Svendsen, 2007) siendo el malondialdehído la sustancia mayoritaria (0.90) de los TBARS en el caballo (Marlin *et al.*, 2002). “Sin embargo, el uso de este parámetro ha sido criticado debido a su baja especificidad (...) y sensibilidad (...)” (Bruynsteen *et al.*, 2014). En relación a las cantidades presentes de MDA en el suero de los caballos de este estudio, tanto en descanso como en el periodo de ejercicio, se encuentran dentro de lo consignado

por diferentes investigadores (cuadro 4.2); siendo mayores en animales transportados por doce horas (Onmaz *et al.*, 2011).

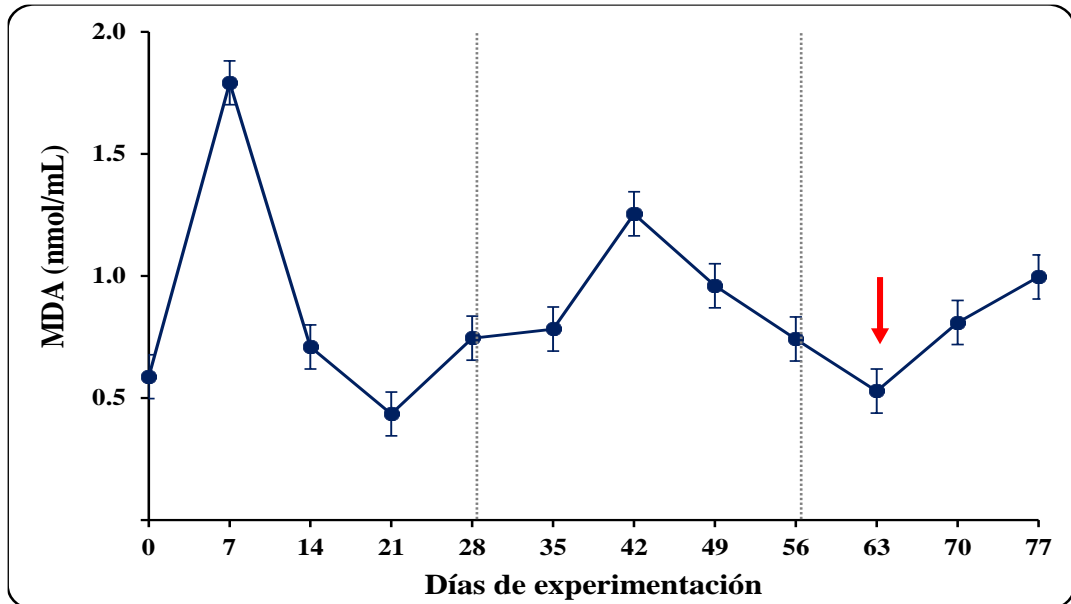


Figura 4.3

Concentraciones promedio de malondialdehído (MDA) en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α tocoferol; 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

Cuadro 4.2 Concentraciones séricas de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol/mL) en suero de caballos

Autor	Tratamiento	Tipo de Ejercicio*	Manejo	
			Antes	Después
Ono <i>et al.</i> (1990)	Se + E IM ¹	Ligero a intenso Los caballos corrieron vigorosamente en una pista de arena por 1000 m a una velocidad de 15 m/s.	1.16	1.29
Chiaradia <i>et al.</i> (1998)	Se + E PO ²	Intenso Los caballos realizaron la siguiente actividad: 8 min de calentamiento (serie de 6 saltos sin jinete) + 2 veces forzados a correr a galope 200 m (con jinete) con 10 minutos de descanso entre galope y galope.	0.07	0.09
Avellini <i>et al.</i> , (1999)	Se + E PO	Moderado a intenso Los caballos realizaron la siguiente actividad: 200 m de galope, 5 min descanso y 200 m de galope.	0.12	0.14
Deaton <i>et al.</i> (2002)	Se + E + C PO	Moderado a intenso Los caballos realizaron lo siguiente: Fueron ejercitados 3 veces/semana durante 4 semanas (lunes, miércoles y viernes): en una “treadmill” con 3 grados de inclinación (5 minutos a 1.7 m/s, 5 minutos a 3.7 m/s, 2 minutos a 90 % VO _{2MAX} , y 5 minutos a 1.7 m/s).	2.10	1.60
Marlin <i>et al.</i> (2002)	-----	Intenso Los caballos tuvieron la siguiente actividad: caminata de 140 km a una velocidad promedio de 16.5 km/h.	0.30	0.40
Al-Qudah <i>et al.</i> (2006)	-----	Intenso Los caballos realizaron una caminata de 120 km.	0.0028	0.003
Andriichuk <i>et al.</i> (2014)	-----	Intenso Los caballos realizaron la siguiente actividad: 5 min caminando, 10 min trote, 10 min caminata, 10 min trote, 5 min caminata, 10 min canter, 10 min caminata.	2.90	3.55
Onmaz <i>et al.</i> (2011) ³	-----	Intenso Los caballos fueron transportados un remolque durante 12 horas.	6.98	11.19

*El tipo de ejercicio físico fue clasificado de acuerdo con el NRC, 2007.

¹IM, intramuscular

²PO, *per os*

A la lista de indicadores de LPO se han sumado los isoprostanos (IsoP) que se forman por la acción de radicales libres sobre el ácido araquidónico presente en las membranas celulares teniendo como ventaja su mayor especificidad. Sin embargo, aunque la cuantificación de las TBARS (MDA) es una valiosa aproximación a la LPO que ha sido ampliamente utilizada, se desconocen valores de referencia ya que la LPO es un fenómeno multifactorial. Marlin *et al.* (2002) citando a otros autores mencionan que caballos en descanso han presentado desde 0.002 hasta 7.00 nmol MDA/mL.

El efecto observado del día ($P < 0.05$) estuvo fuertemente influenciado por la concentración de MDA del día 7. Cabe recordar que en P1 (figura 3.1), los caballos se adaptaron a una dieta en la que no hubo cambios de ingredientes, pero sí en las proporciones de los mismos. La ausencia de la pérdida de peso en P1 indica que los animales mantuvieron su condición corporal; el consumo calórico proveniente de alimentos concentrados disminuyó, en tanto, el del consumo de forraje aumentó; Bruynsteen *et al.* (2014) mencionan que las modificaciones en las dietas que permitan una pérdida de peso incluso limitada, puede ayudar a mejorar el equilibrio oxidante/antioxidante. Además, estos autores observaron que en tres grupos de ponies obesos sometidos a un régimen de pérdida de peso de 16 semanas, las concentraciones de TBARS fueron mayores al inicio de la pérdida de peso que al final, lamentablemente no se presentan los datos en la publicación. En el presente estudio, el incremento de las concentraciones de MDA cuantificado en d 7, convergió con el ajuste en la dieta, lo que puede atribuirse al ajuste metabólico que implica la modificación energética, cuando las reservas energéticas del animal son utilizadas. En este punto surge la siguiente pregunta: ante la elevación de la LPO indicada por la elevación en la concentración de MDA en suero, ¿la complementación con los antioxidantes Se y E benefician al animal? El comportamiento de la curva (figura 4.3) responde afirmativamente ya que 7 días después de esta importante elevación, la concentración sérica de MDA regresa a sus valores basales; así, hasta d 14. Al día 42 se observó la segunda elevación importante, debida al trabajo físico realizado, lo que está ampliamente reportado (Avellini *et al.*, 1999; Deaton *et al.*, 2002; Marlin *et al.*, 2002; Kirschvink *et al.*, 2006; Kirschvink *et al.*, 2008; Soffler, 2007; Soares *et al.*, 2011; Piccione *et al.*, 2012); incluso en caballos

suplementados con 20 µg de Se/kg y 40 UI vitamina E/kg (cuadro 4.2; Avellini, *et al.*, 1999) y sometidos a galope intenso. Por otra parte, Soares *et al.* (2011) reportan el descenso del 0.61 de la concentración de TBARS (4.38 vs 2.66 nmol/L) eritrocitario, 24 horas posteriores al ejercicio realizado, denotando su rápido metabolismo. Después hay un franco descenso lineal [MDA (nmol/mL) = -0.034 día + 1.23; r^2 , 0.994] entre d 42 y d 63, este último día corresponde al momento del retiro de la doble complementación. Las últimas dos semanas las concentraciones de MDA se elevaron nuevamente y en d 77 se presentaron concentraciones no diferentes a las del día 42, lo que se atribuyó a la readaptación al manejo en la UPMM.

4.3 SELENIO Y VITAMINA E

4.3.1 DIETA

Como se presentó en la sección referente a la descripción de la dieta, esta fue pobre en sus contenidos de Se (no se detectó a <2 ng/g) y vitamina E (13.74 UI/kg). En el caso de los ingredientes pobres en Se, este resultado es congruente con lo observado en otros estudios (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001) realizados en México donde se han encontrado deficiencias de este elemento en las diferentes especies de rumiantes tanto alimentadas en pastoreo extensivo (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001) como en pastoreo intensivo con complementación en confinamiento (Ramírez-Pérez *et al.*, 2000), ya que estas especies son las más susceptibles a presentar deficiencias debido al metabolismo ruminal del Se (Hefnawy y Tórtora-Pérez, 2010); la deficiencia de Se en México es un problema que repercute en la nutrición. Lo anterior se debe a factores como: el tipo de planta, su tasa de crecimiento, el suelo donde se cultiva el vegetal y a su contenido de Se (Carmel *et al.*, 1990). Los suelos de los Estados del Altiplano Mexicano son de origen volcánico, los cuales se caracterizan por ser pobres en el metaloide; puesto que, las temperaturas generadas durante una erupción volcánica, provocan su sublimación y pérdida. Además, el azufre, que es un antagonista del Se, persiste en cantidades importantes en este tipo de suelos. Así, se reconoce que los granos, semillas y los forrajes en México son deficientes en el elemento, a excepción de algunas regiones de los Estados de Chihuahua y Coahuila

(López *et al.*, 2012). Los forrajes utilizados en la UPMM provienen del Estado de Hidalgo (alfalfa) y de la zona rural de la CDMX (avena), ambos lugares ubicados en la altiplanicie, lo que explica el contenido no detectable de Se en los forrajes. Además, la presencia de otros elementos (calcio, Cu, arsénico) pueden interferir con la absorción del Se por parte de la planta (Hefnawy y Tórtora-Pérez, 2010). En el concentrado tampoco se logró cuantificar el Se a los límites de detección ya señalados; sin embargo, fue de fabricación nacional. El origen de los ingredientes se desconoce.

Los ajustes en la alimentación equina con vitamina E han incrementado y resulta difícil conciliar los aportes alimentarios con las necesidades. Así, el NRC recomendaba 75.00 y 400.00 UI vitamina E/día, (1989 y 2007; respectivamente), para un potro de 200 kg PV, en crecimiento, con un consumo del 2.5 % de su peso vivo. En el presente estudio, tanto el alimento concentrado como los henos de avena y alfalfa, tuvieron un bajo contenido de α -tocoferol. DellaPenna (2005) menciona que los granos y semillas poseen cantidades mayores a 50 $\mu\text{g/g}$ de tococromanoles; pero, con una baja proporción del α -tocoferol (e. g., 10 % en el grano de maíz), señalan también que las hojas de las plantas no estresadas tienen bajas cantidades (10 – 50 $\mu\text{g/g}$) de tococromanoles, siendo el mayoritario el α -tocoferol (e.g., alcanza el 90 % en *Arabidopsis*). Las concentraciones más altas de α -tocoferol se encuentran en los forrajes frescos y disminuyen en forma inversa al tiempo de conservación; así, el heno llega a perder hasta el 60 % de vitamina E, en sólo cuatro días mientras se seca en el campo y puede perder hasta otro 50 % después de un mes de almacenamiento (Hidiroglou *et al.*, 1992; McDowell *et al.*, 2007), respecto al forraje recién cortado. De hecho, la naturaleza lipídica de los tococromanoles es afectada por diferentes factores como son: los ambientales, por ejemplo: la deshidratación al sol o la fermentación (Moser, 1980), el calor; la humedad; en general, los forrajes de otoño-invierno son más pobres que los de primavera-verano. Müller *et al.* (2007) indican que es muy probable que la especie, el cultivar y la edad de corte de un forraje influyan más en el contenido de α -tocoferol que el método de conservación. También, la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, metales (Fe y Cu); en los alimentos concentrados en relación con la oxidación que aumenta después de la molienda, mezclado con metales, utilización de aceites poli-

insaturados, peletizado, uso de conservadores (ácido propiónico) y el tiempo de almacenamiento (Moser, 1980; Hidiroglou *et al.*, 1992) disminuyen el contenido de tococromanoles.

4.3.2 SANGRE Y SUERO

De las variables explicativas en el modelo estadístico, sólo el nivel de complementación con Se y el tiempo experimental afectaron ($P < 0.05$), tanto los resultados de las concentraciones sanguíneas de Se (cuadro 4.3), como de las concentraciones séricas de alfa-tocoferol.

Las concentraciones promedio globales de estos micronutrientes fueron:

- ★ LSe, 82.01 ng Se/mL (EEM, 3.80); 1.34 $\mu\text{g E/mL}$ (EEM, 0.055);
- ★ HSe, 97.50 ng Se/mL (EEM, 7.00); 1.27 $\mu\text{g E/mL}$ (EEM, 0.062).

En el caso de la vitamina E, en d 0 tuvo valores outliers que influían en los resultados de los análisis estadísticos, por ello los valores de ese día fueron utilizados con los del día 7 como el valor basal (1.19 $\mu\text{g/mL}$).

Cuadro 4.3 Concentraciones sanguíneas de selenio (ng/mL) y séricas de α -tocoferol (Vitamina E, $\mu\text{g/mL}$) en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con selenio (seleno-levadura) y vitamina E (DL- α -tocoferol)

Ítem	MEDIAS MÍNIMO CUADRÁTICAS				EEM	Valor de <i>P</i>						
	LSeLE ¹ (n = 6)	HSeLE ² (n = 6)	LSeHE ³ (n = 6)	HSeHE ⁴ (n = 6)		Se	E	Se × E	d	d × Se	d × E	d × Se × E
Selenio	84.15	95.95	74.95	99.09	5.38	0.009	0.317	0.123	<0.0001	0.606	0.660	0.910
Vitamina E	1.30	1.37	1.38	1.18	0.10	0.001	0.735	0.128	0.024	0.173	0.238	0.450

¹LSeLE, 0.1 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

²HSeLE, 0.3 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

³LSeHE, 0.1 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

⁴HSeHE, 0.3 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

EEM, error estándar de la media

d, día

En lo referente al comportamiento del Se a través del tiempo (figura 4.4), la concentración basal (d 0), fue de 42.59 ng/mL (EEM, 6.88), no mostró diferencia estadísticas hasta d 14 ($P > 0.05$; 59.13 ± 3.40 ng/mL). Al día 21, las concentraciones del analito incrementaron ($P < 0.05$) 2.8 veces respecto del valor basal; sin embargo, el valor más importante se obtuvo al día 28 ($P < 0.05$; 210.76 ± 16.98 ng/mL), lo que significa un incremento de 5.03 veces respecto a los valores basales; con un coeficiente de variación de 37.15 %. Las concentraciones del metaloide descendieron nuevamente y a partir de d 42 hasta d 77 no hubo variaciones importantes ($P > 0.05$; 75.65 ± 2.53 ng/mL).

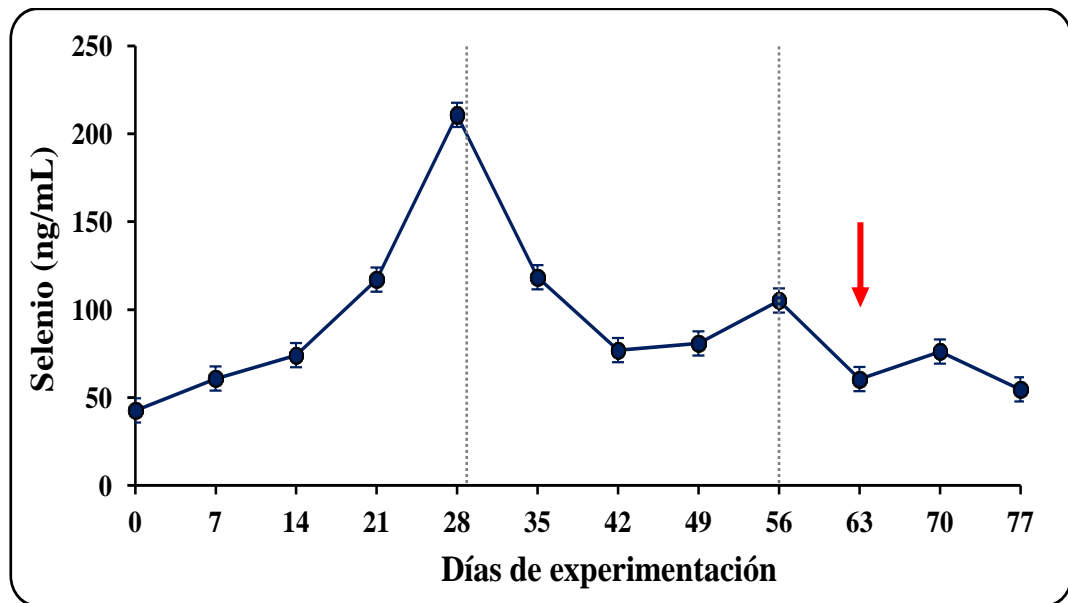


Figura 4.4 Concentraciones promedio de selenio en sangre de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

En el estudio de Carmel *et al.* (1990) realizado en los caballos residentes en Maryland (USA) sobre su *status* de Se, se señalan concentraciones en sangre completa ≥ 100 ng Se/mL como adecuadas, en tanto concentraciones entre 50 y 100 ng Se/mL son consideradas para animales con una deficiencia marginal; por lo que se asume que, concentraciones ≤ 50.00 ng Se/mL serían las observadas en animales con deficiencias severas. Por otra parte, Stowe y Herdt (1992) propusieron para caballos adultos, valores “normales” de 130 a 160 ng Se/mL de suero; además reportaron que la proporción de Se en sangre completa / Se en suero va de 1.4 a 1.5. Estas cantidades implican que las concentraciones sanguíneas “normales” consideradas por Stowe y Herdt (1992) son de 182 a 240 ng/mL. Estos datos se obtuvieron de 599 caballos de razas de sangre caliente, con un rango entre 71.40 a 637.50 ng Se/mL estimados para sangre completa. Calamari *et al.* (2009; citan a Puls, 1994) señalan concentraciones de 8.00 a 53.00 ng Se/mL en plasma (11.20 a 79.50 ng Se/mL de sangre completa, estimados con las proporciones de Stowe y Herdt, 1992) como indicadores de deficiencia del micronutriente. La concentración estimada como indicadora de toxicidad es de 1392.00 ng Se/mL de sangre completa (Stowe y Herdt, 1992). Si bien, algunos componentes de la dieta (ácidos grasos poliinsaturados y nitritos) pueden interferir con la absorción intestinal de Se (Combs y Combs, 1986); su concentración en la dieta se refleja en las concentraciones de Se en plasma y sangre (Calamari *et al.*, 2009a). En el presente estudio, el límite instrumental de detección de Se fue de 2 ng/g, sin embargo, en los ingredientes de la dieta no se logró cuantificar. Esto, aunado a que la adquisición de alimentos en la UPMM se hace para largos periodos del año, explica las concentraciones de deficiencia del elemento en d 0. Esta deficiencia fue de tipo subclínico; sin embargo, después de 7 días de complementación con la seleno-levadura, las concentraciones observadas (aunque estadísticamente no fueron diferentes, $P > 0.05$), correspondieron a una carencia marginal de acuerdo con Carmel *et al.* (1990), misma que continuó hasta 14d. Únicamente se cuantificaron concentraciones de Se mayores que 100 ng/mL de sangre completa, los días 21, 28, 35 y 56, lo que genera la siguiente pregunta: ¿Cuánto tiempo es necesario para que animales deficientes puedan restablecer sus concentraciones sanguíneas “normales” de Se? Calamari *et al.* (2009), observaron que caballos de silla italianos con ejercicio ligero, suplementados con Se

orgánico o inorgánico incrementaron sus concentraciones plasmáticas de Se respecto a un grupo control negativo, después de recibir durante 4 semanas las dietas experimentales, alcanzando la meseta entre los 75 y 90 días de complementación, lo que no se observó para la sangre completa después de los 112 días de complementación; en el caso de ésta, el efecto es más lento ya que se requiere la incorporación del Se a la GPx-1 (la cual es de origen eritrocitario), situación que ocurre durante la eritropoyesis (Maylin *et al.*, 1980; Stowe y Herdt, 1992) que en caballos es de 140 a 150 días (Carter *et al.*, 1974). Por ello, la concentración de Se en la sangre completa es considerada (Maylin *et al.*, 1980; Stowe y Herdt, 1992; Calamari *et al.*, 2009a) como indicador a largo plazo del *status* nutricional de Se. En el estudio de Calamari *et al.* (2009) los incrementos observados en las concentraciones plasmáticas de Se estuvieron entre 0.5 – 0.6, 0.85 – 0.93 y 1.0, para 28, 56 y 84 días de complementación.

Mientras que, en el trabajo de Calamari *et al.* (2009) los equinos utilizados tuvieron ≈ 186.00 ng Se/g de sangre total previo a la complementación con Se-levadura equivalente a 0.3 mg Se/kg MS por 112 días. En este grupo de animales, a los 84 días de estar recibiendo la complementación, la concentración de Se en sangre aumentó 2.19 veces y a los 112 días alcanzó un incremento de 2.67 veces. En esta investigación, las concentraciones de Se en la sangre se elevaron rápidamente en respuesta a la complementación dietaria del elemento. Así, en solo 3 semanas éstas fueron 2.80 veces mayores que la concentración basal y a las 4 semanas el incremento fue de 5.03 veces. Para después decaer al inicio de P2 (ejercicio). ¿Por qué en las Unidades Experimentales de este estudio, el incremento en las concentraciones fue tan rápido? Primeramente, cabe recordar que dado el tiempo de complementación, se asume que el incremento observado fue principalmente en el plasma ya que la incorporación de Se a la GPx-1 es lenta y se realiza durante la eritropoyesis; la tasa de reemplazo eritrocitario es del 1 % al día (Knight y Tyznik, 1990). En un estudio realizado en ponies de 1, de 2 ó 3 años de edad, de la raza Shetland con deficiencia crónica experimental de Se, a los cuales se les suplementó con 0.02 ó 0.22 mg Se/kg de dieta durante 7 semanas, se observó que los ponies de 2 a 3 años de edad que recibieron el nivel alto, incrementaron rápidamente su concentración sanguínea de Se 1.95 veces a los 21 días

de estar recibiendo la complementación. A los 42 días de suplementados, el incremento fue de 2.58 veces respecto a la observación inicial; es decir, en estos animales deficientes, las concentraciones sanguíneas de Se se recuperaron rápidamente y fueron afectadas ($P < 0.05$) por la interacción nivel de complementación y edad. De esta forma, la deficiencia subclínica del analito podría ayudar a explicar la rápida respuesta a la complementación. Otros autores (Richardson *et al.*, 2006; Calamari *et al.*, 2009a; White *et al.*, 2016), declaran que en caballos sedentarios los incrementos de Se en plasma y en los eritrocitos se observan entre la 4^a y 5^a semana de iniciada la suplementación.

Por otra parte, ¿por qué las concentraciones sanguíneas de Se se quintuplicaron al inicio del ejercicio? y ¿por qué las concentraciones decayeron tan rápido, 7 días después del inicio del ejercicio? El incremento ($P < 0.01$) en las concentraciones sanguíneas de Se por efecto del ejercicio ha sido observado (Pagan *et al.*, 1999) en caballos PSI después de realizar un trabajo intenso donde el analito aumentó con una complementación de 0.4 mg Se/kg de la dieta, aportado por selenito de sodio (de 205.1 a 216 ng/mL) o por Se-levadura (de 201 a 224.5 ng/mL). Estos incrementos representan una diferencia ≈ 1.11 veces entre el antes y después del ejercicio. El tipo de ejercicio, su duración y el tiempo transcurrido entre el término del ejercicio y la toma de la muestra sanguínea afectan la concentración sanguínea de Se. Las concentraciones de Se sanguíneo descienden a las 24 h de terminada la actividad física; si la complementación se realiza con una fuente inorgánica, el descenso es más rápido observándose el cambio desde las cuatro horas post-ejercicio (Pagan *et al.*, 1999). Estos incrementos ($P < 0.05$) han sido también observados en caballos de endurance (Haggett *et al.*, 2010) que recorrieron 80.47 y 160.93 km (50 y 100 millas), donde se cuantificaron incrementos del Se sanguíneo (de 170 ± 79 a 180 ± 81 ; de 220 ± 55 a 240 ± 54 , ng de Se/mL de sangre; para 50 y 100 millas, respectivamente). Sin embargo, en el presente estudio el incremento fue mayor, lo que puede ser explicado por el comportamiento del hematocrito que aumenta hasta en 10.30 % (Boucher *et al.*, 1981) después de la realización de 44 km de endurance por la liberación esplénica de sangre a la circulación central, estimulada por la acción del sistema nervioso simpático, la que puede alcanzar hasta 12 L (McKeever *et al.*, 1993). En ejercicio intenso también se ha observado

este incremento en el hematocrito (13.7 %; Thomas y Fregin, 1981). Otro factor que pudo influir en el incremento de Se en sangre completa es la disminución del plasma sanguíneo (hemoconcentración) por la sudoración (Boucher *et al.*, 1981). El rápido decremento en la concentración del analito observado en d 35 puede atribuirse a que el inicio de la actividad física pudo ocasionar una redistribución del Se ante el desafío metabólico que exige el ejercicio físico. Hefnawy y Tórtora-Pérez (2010) señalando a varios autores indican que “(*...*). Si el Se es limitado, el sistema da prioridad a los órganos centrales (cerebro, pituitaria, tiroides, adrenales) para la síntesis de seleno-enzimas; en estas condiciones la GSH-PX es la última prioridad.” Deagen *et al.* (1987) utilizaron fuentes inorgánicas (selenito) y orgánicas (Se-Cys y Se-Met) en ratas, donde observaron que si bien, el Se fue incorporado de forma importante en el hígado, riñón, testículos y en la sangre, la mayor deposición de la Se-Met (forma mayoritaria en las Se-levaduras; Kelly y Power, 1995) fue cuantificada en el músculo estriado esquelético.

Reiterando, las concentraciones séricas de α -tocoferol fueron afectadas ($P < 0.05$) por el nivel de Se y por el tiempo (cuadro 4.3). Pero, como en d 0 hubo valores outliers que influían en los resultados, se utilizaron los valores del día 0 como covariable de los observados para construir el valor basal. *Grosso modo* se puede decir que los caballos del grupo LSe tuvieron las concentraciones séricas promedio globales de α -tocoferol mayores ($P < 0.001$) que las cuantificadas en el grupo HSe ($1.34 \mu\text{g E/mL} \pm 0.055 \text{ EEM}$ vs $1.27 \mu\text{g E/mL} \pm 0.062 \text{ EEM}$, respectivamente).

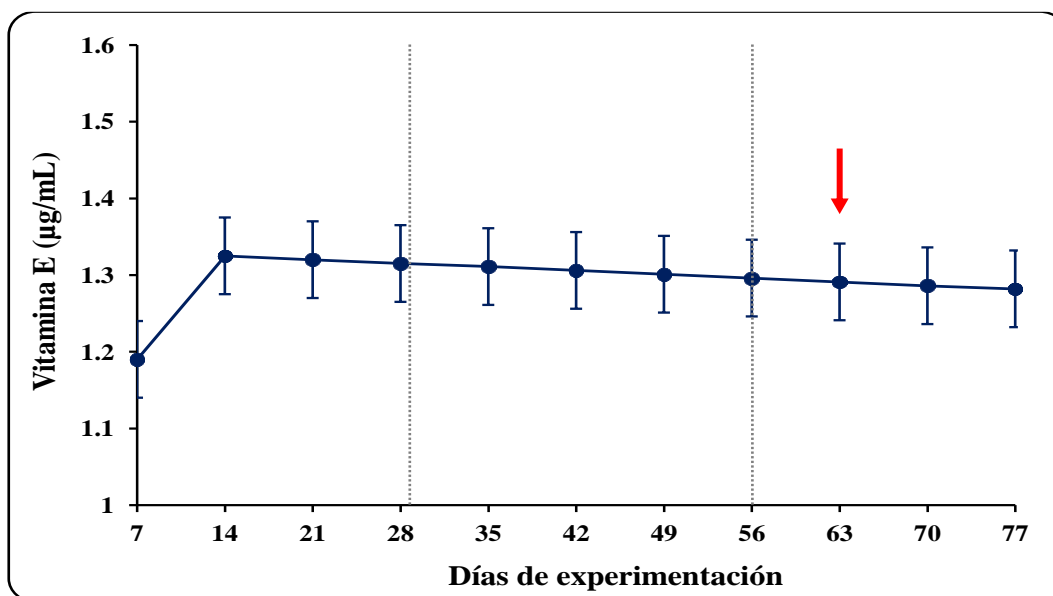


Figura 4.5 Concentraciones promedio de vitamina E en suero de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

La investigación sobre el papel protector del Se y E contra el estrés oxidativo, data de los años 60 (Carmel *et al.*, 1990). Sin embargo, sus mecanismos de acción se han ido dilucidando poco a poco; e.g., Combs y Scott (1977) mencionaron que la deficiencia de estos nutrientes, causaba un retardo en el crecimiento del pelo del caballo. Lo que en la actualidad se sabe, es que sus funciones las realizan a nivel molecular y que, ambos micronutrientes funcionan cooperativamente en la protección de las membranas tanto de las células, como de los organelos que contienen principalmente la mitocondria y los microsomas. Finno y Valberg (2012) en una amplia revisión de la literatura establecen tres condiciones con base en las concentraciones séricas de α -TOC expresadas en $\mu\text{g/mL}$: *i*) adecuado, >2 ; *ii*) marginal, 1.5 a 2 y *iii*) deficiente, <1.5 . En un estudio realizado en Alberta, Canadá (Blakley y Bell, 1994) para determinar los valores basales de vitamina A y

E en caballos clínicamente sanos, mantenidos en las condiciones de la zona, se reportaron 3.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cantidad que queda comprendida en los $>2 \mu\text{g}/\text{mL}$ señalados como resultado de un *status* adecuado de α -TOC (Finno y Valberg, 2012). Esos caballos alimentados en pastoreo presentaron $4.89 \pm 0.211 \mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que los alimentados con forrajes conservados tuvieron $3.00 \pm 0.069 \mu\text{g}/\text{mL}$. Estos valores (Blakley y Bell, 1994; Finno y Valberg, 2012) indican una deficiencia subclínica de α -TOC durante todo el presente estudio; deficiencia que se explica por la dieta pobre en α -TOC, proporcionada cotidianamente en la UPMM. Sin embargo, aunque los caballos estuvieron deficientes en Se y α -TOC no presentaron signos clínicos. Con la finalidad de tener información de otro indicador del *status* mineral de los caballos, en este protocolo se tomaron en d 0 muestras del pelo de la cruz; sin embargo, el pelo no recuperó su crecimiento en todo el periodo experimental, por lo que no se pudieron obtener datos. Esta falta en el crecimiento del pelo, apoya de forma empírica las primeras observaciones respecto a las funciones del Se y E en el organismo (Combs y Scott, 1977).

En relación con el efecto del nivel de Se en las concentraciones séricas de α -TOC ¿Por qué los caballos del grupo LSe tuvieron una concentración sérica mayor de α -TOC, en comparación con los del grupo HSe? En 1965, Desai y Scott observaron que en pollos la complementación con Se inorgánico mejoró la actividad del α -TOC, al mejorar su retención y evitar su destrucción en la sangre. McDowell *et al.* (2007) menciona las acciones complementarias entre el Se y la vitamina E, donde un mayor nivel de uno de los micro nutrientes disminuiría la necesidad del otro.

El selenio:

- ❖ ayuda a mantener la salud pancreática lo que favorece la digestión de las grasas y con ello, la absorción normal de la vitamina E (en función de si está o no esterificada),
- ❖ mediante su participación en la GPx, disminuye el requerimiento de vitamina E porque mantiene la integridad de las membranas,
- ❖ contribuye a la retención plasmática de la vitamina E.

La vitamina E:

- ❖ disminuye la necesidad de Se,
- ❖ preserva la forma activa del Se o disminuye su pérdida,
- ❖ inhibe la formación de hidroperóxidos, evitando el daño a las membranas, ayudando a disminuir la cantidad de GPx.

En referencia a esta última acción Se-E, en este estudio se cuantificó la actividad de la GPx-1 de los eritrocitos, la que se discutirá más adelante.

El comportamiento de las concentraciones de α -TOC en suero a través del tiempo se presenta en la figura 4.5, donde se observa que la diferencia ($P < 0.05$) se estableció entre el valor basal d 0 y d 7 ($1.19 \mu\text{g/mL}$) y el resto del periodo experimental de d 14 a d 77 ($1.44 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$). Diferencialmente a los resultados de las otras variables en estudio, no se observó el efecto atribuible al ejercicio físico. A este respecto, en algunos trabajos se ha encontrado el efecto por la actividad (Avellini *et al.*, 1999; Williams y Carlucci, 2006; Rey *et al.*, 2013) y en otros no (Marlin *et al.*, 2002). Así, después de observar el incremento en las concentraciones séricas de α -TOC por el inicio de la complementación ésta se mantuvo sin cambio hasta terminar el experimento, sin alcanzar los $2 \mu\text{g/mL}$ que están considerados como el valor límite entre la deficiencia y la suficiencia en la vitamina (Finno y Valberg, 2012). Pero, ¿por qué no incrementaron los valores séricos de α -TOC con la complementación de acetato de α -tocoferilo (DL- α -tocoferol)? La explicación a este resultado está en función de la biopotencia de la fuente vitamínica utilizada y de su metabolismo. Como ya se explicó, la química de la vitamina E, la hace muy susceptible para que sea descompuesta por el tiempo de almacenamiento y otros factores medio ambientales; por ello, la industria alimentaria utiliza formas sintéticas esterificadas para conferirle mayor vida de anaquel. Como se mencionó en el capítulo de materiales y métodos, la fuente empleada para suplementar a los caballos fue DL- α -tocoferil acetato, el cuadro 4.4 presenta la diferencia en UI (que han sido calculadas a partir de una prueba de mantenimiento de la gestación en ratas (Scherf *et al.*, 1996; Pagan *et al.*, 2010), de las fuentes utilizadas para suplementar vitamina E; en él se aprecia que el producto

considerado con mayor biopotencia o bioactividad por tener mayores UI por mg es el D- α -tocoferol (alcohol).

Cuadro 4.4 Biopotencia de diferentes fuentes de vitamina E (*A partir de: Pagan et al., 2010; OVM-DSM, 2017*)

Ítem	UI	mg
DL-α-tocoferil acetato (sintético)	1.00	1.00
D-α-tocoferil acetato (natural)	1.36	1.00
D-α-tocoferol (alcohol)	1.49	1.00

A partir de: Pagan *et al.* (2010); OVM-DSM (2017)

Las diferentes fuentes de vitamina E son absorbidas en el intestino delgado, con las micelas con una variabilidad importante; por ejemplo, Scherf *et al.* (1996) mencionan un rango de variabilidad desde 10 hasta 70 %, para el D- α -tocoferol. Aunque, está es la forma más biopotente, es de fácil destrucción a nivel digestivo; por ello, su unión con el acetato le proporciona la forma para arribar a la pared intestinal, que se escinda el acetato, se recree la forma alcohol y se absorba el α -tocoferol (McDowell *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio (Howard *et al.*, 1992; citado por Scherf *et al.*, 1996) mencionan que no se observaron diferencias en las concentraciones sanguíneas de α -TOC en caballos suplementados por 49 días con 60 mg/kg de D o DL- α -tocoferil acetato, lo que indica que la diferencia en la biopotencia de las fuentes no se vio reflejada en los resultados. Existe controversia a este respecto, ya que en otro estudio más reciente (Fiorellino *et al.*, 2009) se observó la tendencia ($P < 0.07$) del efecto del tipo de fuente utilizada como suplemento oral de vitamina E (4000 UI/día/animal) en la concentración sérica de α -TOC en yeguas, cuya concentración basal fue aproximadamente 1.94 μ g/mL, incrementándose 1.91 veces 7 días después de recibir los suplementos RRR- α -tocoferil o RRR- α -tocoferol. La fuente vitamínica que influyó para la tendencia observada fue RRR- α -tocoferol micelizado.

Cabe señalar que, las yeguas de ese trabajo tuvieron una concentración sérica basal de α -TOC $<2 \mu\text{g/mL}$; además, las fuentes empleadas fueron de las consideradas con más biopotencia (1.36 y 1.49 UI/mg, respectivamente). Pagan *et al.* (2010) observaron en PSI que la administración *per os* de 5000 UI de D- α -tocoferol nanodispersado en liposomas fue mejor absorbido e incrementó ($P < 0.05$) la concentración sérica basal ($2.97 \mu\text{g/mL}$) de α -TOC en comparación con 5000 UI de DL- α -tocoferil acetato (3.6 vs $6.69 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Considerando el peso estándar del PSI de 500 kg, la dosis estimada que se proporcionó fue de 10 UI/kg PV. También, en el estudio de Fiorellino *et al.* (2009), la complementación administrada fue de 8.6 UI/kg PV, es decir en ambos trabajos se multiplicaron varias veces las recomendaciones del NRC (2007). En el presente estudio, se utilizó el DL- α -tocoferilo acetato (1 UI/mg), cuyas recomendaciones de uso por parte del fabricante están entre las recomendadas por el NRC (2007) hasta incrementos de dos o tres veces (DSM, 2016).

La absorción del DL- α -tocoferol también pudo afectarse por el contenido lipídico de la dieta que fue de 38.20 g/kg MS. En el estudio de Siciliano y Wood (1993) se suplementaron durante 90 días, caballos cuarto de milla y cuarto de milla \times PSI con 1.38 UI de DL- α -tocoferilo acetato por kg PV, la única diferencia entre las dos dietas experimentales fue la inclusión de 64.00 g de aceite de soya por kg en una de ellas. La concentración sérica basal de α -TOC estimada para ambos grupos fue de $3.90 \mu\text{g/mL}$; a los 90 días, la concentración del analito fue mayor ($P < 0.05$) para el grupo alimentado con aceite de soya ($6.10 \mu\text{g/mL}$) respecto al que recibió la dieta control ($4.70 \mu\text{g/mL}$). Lo que deja ver una mejor utilización digestiva del DL- α -tocoferilo acetato cuando se incluye en la ración 6.4 % de grasa. Otro aspecto relevante del trabajo de Siciliano y Wood (1993) fue que la dosis del suplemento vitamínico se dividió por dos veces al día. Por otra parte, Williams y Carlucci (2006) alimentaron por 21 días a yeguas Standardbred con 0.26, 10.87 y 21.74 UI/kg PV, el contenido lipídico de la dieta fue de 40.00 g/kg y sólo observaron una diferencia ($P < 0.05$) respecto al valor basal ($3.48 \mu\text{g/mL}$) y entre las concentraciones séricas los grupos experimentales de α -tocoferol 24 h después de la realización de ejercicio físico intenso (3.62 , 4.57 y $5.11 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). La ausencia de diferencias en la

concentración sérica de α -tocoferol entre grupos aún con las diferencias importantes en las cantidades aportadas, fue atribuida en parte a la cantidad de grasa dietaria. El proceso de absorción requiere de las secreciones pancreática y biliar. En este punto cabe recordar que la carencia de vesícula biliar del caballo puede jugar en contra de la absorción del DL- α -tocoferilo acetato. De las observaciones anteriores y de los resultados de esta investigación podría sugerirse proporcionar la complementación *per os* dividida en varias ingestas al día y no proporcionar todo el producto en una sola toma, se requiere la realización de estudios a este respecto.

Por otro lado, un factor más que actúa en contra de elevar la concentración sérica de α -TOC en animales suplementados con DL- α -tocoferil acetato es la afinidad altamente selectiva de la proteína de transferencia del α -TOC (α -TTP) con el α -TOC para su incorporación en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). De esta forma la selectividad de las isoformas de “vitamina E” reside en el hepatocito (Finno y Valberg, 2012). Esta afinidad presenta una K_d de 25 nM (Panagabko *et al.*, 2003) por lo que la vida media del analito en el plasma es mayor en relación con otras isoformas (Finno y Valberg, 2012). Por otra parte, el caballo almacena en el hígado más carotenos y vitamina A que tocoferoles (Kentucky Equine Research, 2013). Como ya se mencionó, los caballos tuvieron concentraciones séricas de α -TOC señaladas como deficientes; existe una rapidez diferencial de agotamiento y repleción del α -TOC en los tejidos y órganos del individuo después de un periodo de carencia y de complementación, respectivamente (Bieri, 1972). Weiser *et al.* (1992) observaron en pollos, el incremento de las concentraciones de α -TOC en el cerebro, hígado, tejido adiposo y plasma después de 90 días de complementación. El músculo estriado, el tejido adiposo (Bieri, 1972; Finno y Valberg, 2012) y el sistema nervioso (Finno y Valberg, 2012) son considerados los tejidos más estables donde el α -TOC se agota y repleta lentamente antes los cambios dietarios.

Recientemente, se ha ampliado el interés para realizar investigación en relación con la vitamina E (Azzi *et al.*, 2016; Galli *et al.*, 2017). Azzi (2017) cita la pregunta elaborada por Henry Albright Mattill (1883-1953) quien descubrió el papel antioxidante de la vitamina E

“¿La vitamina E es únicamente un antioxidante químico o más allá de eso, también tiene un papel fisiológico? (...) Varias consideraciones no favorecen la explicación simple de que la vitamina E no es más que un antioxidante químico en el tejido vivo.” En efecto, el conocimiento sobre las funciones de la vitamina E ha incrementado: protege de los síntomas neurológicos en humanos (Azzi *et al.*, 2016; Azzi, 2017) y equinos (Brown *et al.*, 2017), mejora la respuesta inmune, protege al hígado de la cirrosis no alcohólica, por mencionar algunas, incluso controladas genéticamente. Paradójicamente, se menciona (Saldeen y Saldeen, 2005) la actividad del γ -TP en proporción con el α -TOC para proteger a los tejidos de la oxidación y potencializar otras funciones de la vitamina, y se reafirma la potencia y actividad de vitamina E sólo para el α -TOC (Azzi, 2017).

Se ha calculado que caballos de endurance en una carrera de 80 km, el consumo de pastura debe ser al menos del 2.5 % de su PV y que la complementación con vitamina E debe ser de 1150 a 4700 UI/d en la dieta total durante este periodo, lo que equivale a dar 1.2-5 veces más de lo recomendado por el NRC (2007); sin embargo, se debe tener precaución al suplementar con vitamina E ya que caballos que reciben dosis de 10 veces más que lo recomendado (NRC, 2007) no disminuyen sus niveles de estrés oxidativo en comparación con el grupo control (Williams y Carlucci, 2006), ya que se encontraron niveles bajos de β -caroteno en el grupo experimental en comparación con el grupo control, lo que puede indicar que la vitamina E tiene un efecto inhibitorio sobre el metabolismo del β -caroteno (Williams, 2010).

Wichert *et al.* (2002) mencionaron que las recomendaciones alimentarias de Se podrían estar sobrestimadas cuando los caballos tienen el aporte adecuado de vitamina E, lo que podría deberse a que se toma como parámetro, el contenido del elemento en plasma en relación con el consumo, la presencia de signos clínicos de deficiencia de Se, solo se presentan con la deficiencia de vitamina E.

4.4 ENZIMAS INDICADORAS DE DAÑO MUSCULAR: CREATINA QUINASA, CK; ASPARTATO AMINOTRANSFERASA, AST Y LACTATO DESHIDROGENASA, LDH

Las actividades séricas de las enzimas asociadas al daño muscular: creatina quinasa, CK; aspartato aminotransferasa, AST y lactato deshidrogenasa, LDH; mostraron tendencias ($P < 0.1$; cuadro 4.5) a ser afectadas por algunas de las variables incluidas en el modelo. La triple interacción ($Se \times E \times d$) mostró una tendencia ($P = 0.099$) para afectar la actividad sérica de la CK.

Al respecto, cabe señalar que en d 21, los caballos del tratamiento LSeLE incrementaron la actividad de la enzima hasta 298.33 ± 78.99 U/L; pero, con la variación más importante (CV, 64.86 %) de todo el periodo experimental. Mientras que, en d 42, los tratamientos LSeLE y HSeHE incrementaron la actividad de CK en suero (267.50 ± 39.51 U/L; 248.33 ± 42.58 U/L, respectivamente) valores que pudieron aportar a la tendencia observada. La actividad sérica de la AST (cuadro 4.5), mostró una tendencia ($P = 0.083$) a ser afectada por el nivel de complementación con selenio (HSe, 278.17 ± 4.97 U/L; LSe, 307.81 ± 5.95 U/L). La actividad sérica de la LDH mostró una tendencia ($P = 0.061$) para el efecto del nivel de complementación con vitamina E (HE, 454.25 ± 9.992 U/L; LE, 544.11 ± 10.54 U/L). También se observó una tendencia ($P = 0.084$) para la interacción del nivel de la vitamina y el día ($E \times d$). Al respecto de la tendencia observada para el efecto del nivel de complementación vitamínica, se observó que el comportamiento la actividad de LDH para ambos niveles, a través del tiempo fue prácticamente paralelo; no se observó diferencia ($P > 0.05$) en la actividad de d 0 (469.60 ± 18.80 U/L), 35 (506.50 ± 26.50 U/L) y 49 (490.00 ± 24.40 U/L). Estos resultados pudieron aportar para la tendencia de la interacción $E \times d$.

Cuadro 4.5 Actividades séricas (U/L) de CK, creatina quinasa; AST, aspartato amino transferasa y LDH, lactato deshidrogenasa en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con selenio (seleno-levadura) y vitamina E (DL- α -tocoferol)

Ítem	MEDIAS MÍNIMO CUADRÁTICAS				EEM	Valor de <i>P</i>						
	LSeLE ¹ (n = 6)	HSeLE ² (n = 6)	LSeHE ³ (n = 6)	HSeHE ⁴ (n = 6)		Se	E	Se × E	d	d × Se	d × E	d × Se × E
CK	199.07	198.11	179.57	191.04	11.97	0.280	0.665	0.609	<0.001	0.139	0.629	0.099
AST	317.94	295.86	269.43	268.31	20.83	0.083	0.584	0.620	<0.001	0.597	0.288	0.787
LDH	532.47	454.96	549.79	452.36	43.52	0.867	0.061	0.847	<0.001	0.646	0.084	0.979

¹LSeLE, 0.1 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

²HSeLE, 0.3 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

³LSeHE, 0.1 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

⁴HSeHE, 0.3 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

EEM, error estándar de la media

d, día

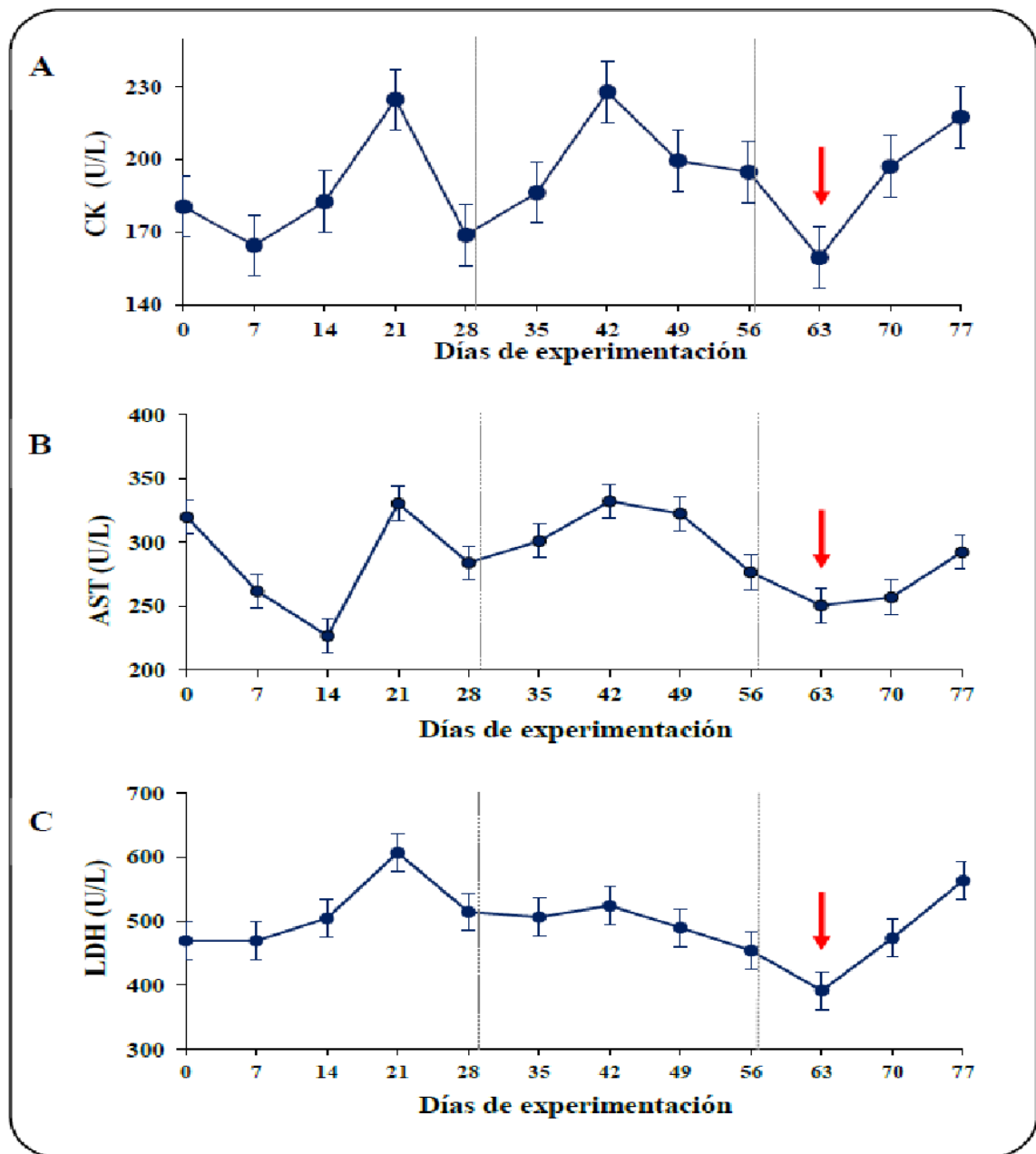


Figura 4.6 Actividad de (A) CK, creatina quinasa; (B) AST, aspartato aminotransferasa y (C) LDH, lactato deshidrogenasa, en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

El efecto más importante para las actividades séricas de la CK, AST y LDH, fue el del día experimental ($P < 0.001$, figura 4.6). En la figura 4.6 A, se aprecia que la actividad basal (d 0, 180.5 ± 12.56 U/L) no presentó variaciones importantes hasta el día 14, cuando comenzó a incrementar y hacia el día 21, la actividad alcanzó 224.79 ± 12.56 U/L, es decir 1.23 veces más que lo obtenido en d 14. El día previo (d 2d) al inicio del ejercicio físico, la actividad de la CK descendió a 168.75 ± 12.56 U/L. En d 42, se observó nuevamente el aumento ($P < 0.001$, 227.92 ± 12.56 U/L) en la actividad enzimática que correspondió con la tercera semana de ejercicio físico. Las actividades de CK cuantificadas en d 21 y d 42 no fueron diferentes ($P > 0.05$, 226.40 ± 13.40 U/L) entre sí. Después de la elevación en d 42, la actividad de CK disminuyó ($P < 0.05$) gradualmente hasta el día 63 (159.38 ± 12.56 U/L) momento en que se suspendió la complementación experimental. Al final de este estudio (d 77), los valores de la actividad se incrementaron una vez más. Cabe enfatizar que, las actividades en d 21 (periodo de adaptación), d 42 (periodo de ejercicio físico) y d 77 (periodo de readaptación) no fueron diferentes ($P > 0.05$, 223.4 ± 9.24 U/L).

En lo que se refiere al efecto del tiempo sobre AST, en d 0 se cuantificó una actividad de 319.70 ± 13.30 U/L, la que descendió en d 14 a 226.60 ± 13.30 U/L, incrementándose ($P < 0.05$) de forma importante siete días después alcanzando valores de $330.4 \text{ U/L} \pm 13.3 \text{ EEM}$; para descender ($P < 0.05$) nuevamente en d 28 a $283.90 \text{ U/L} \pm 13.30 \text{ EEM}$ (un día previo a la semana de ejercitación física); para elevarse ($P < 0.05$, d 42 vs d 28) nuevamente en d 42 alcanzando una actividad de 332.2 ± 13.3 U/L, en d 63, la actividad descendió ($P < 0.05$) a 250.4 ± 13.3 U/L, este comportamiento se mantuvo el resto del periodo experimental. En d 77 el valor observado 292.2 ± 13.3 U/L mostró un incremento ($P < 0.05$), en comparación con lo cuantificado en d 63.

Por otra parte, el comportamiento de la LDH entre d 0 y d 14, no tuvo variaciones importantes ($P > 0.05$; 481.36 ± 12.28 U/L). En d 21, se observó un incremento ($P < 0.05$) de la actividad de LDH alcanzando valores de 606.79 ± 29.00 U/L, misma que fue la más elevada ($P < 0.05$) de todo el periodo experimental. La actividad en d 28 fue menor ($P < 0.05$) y se mantuvo sin grandes variaciones en el periodo correspondiente al ejercicio

físico (d29 – d56, 498.53 ± 11.34 U/L). Al momento del retiro de la doble complementación (d 63) se observó la actividad menos importante de la enzima ($P < 0.05$, 391.00 ± 29.35 U/L). Al final del periodo experimental (d 70 y d 77), la actividad enzimática se incrementó nuevamente ($P < 0.05$) respecto al día 63, hasta alcanzar valores de 563.29 ± 29.35 U/L, en d 77.

De forma general se observó el incremento ($P < 0.05$) de las tres enzimas en d 21 (P1) y d 77 (P4). En tanto, en d 42 (P2) hubo un incremento pero sólo de CK y AST. Las enzimas CK, AST y LDH se encuentran contenidas en las células sanas por lo que su actividad en suero es usualmente baja (Teixeira-Neto *et al.*, 2008) y su cuantificación constituye una prueba para evaluar la enfermedad muscular; pero, ella también se eleva por la realización de actividad física (Kingston, 2008; Teixeira-Neto *et al.*, 2008; Bernard, 2013), que puede dañar (Kingston, 2008; Teixeira-Neto *et al.*, 2008) o no (Valberg *et al.*, 1993; Kingston, 2008; Teixeira 2008) a la célula muscular. CK se libera rápidamente y alcanza su pico de actividad en 4 – 12 h después del daño y tiene una vida media ($T_{1/2}$) de 2 h (Teixeira-Neto *et al.*, 2008). Los valores de actividad sérica de las enzimas están en función del daño ocasionado o en el caso del ejercicio físico en relación con la intensidad y duración del mismo. El cuadro 4.6 presenta algunos valores de referencia.

El incremento en las actividades de las tres enzimas en los caballos se mantuvo dentro de lo consignado en la literatura (cuadro 4.6), de estos resultados y de la ausencia de signos clínicos, se concluye que los caballos experimentales no sufrieron daño muscular, lo que no era objetivo de este trabajo.

Cuadro 4.6 Actividad sérica (U/L) de creatina quinasa, aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa en equinos sanos

Enzima	Rangos de referencia		
	Creatina quinasa (CK)	Aspartato aminotransferasa (AST)	Lactato deshidrogenasa (LDH)
Brady <i>et al.</i> (1978)	11 200	168 000	725 000
Muñoz <i>et al.</i> (2002) ¹	90 – 275	230 – 311	150 – 240
Valentine (2005) ²	350	425	450
Kirschvink <i>et al.</i> (2006)	228 – 383	-----	482 – 674
Teixeira-Neto <i>et al.</i> (2008)	227 – 259	327 – 331	448 – 535
Kedzierski <i>et al.</i> (2009)	134 – 189	294	363 – 417
El-Deeb y El-Bahr (2010)	202.6	275.3	501.5
Tadich <i>et al.</i> (2013)	133 – 333	120 – 480	-----
McKenzie <i>et al.</i> (2014)	145 – 633	199 – 413	-----

¹ A partir de McEwen y Hulland, 1986; Valberg *et al.*, 1993.

² Límite alto aceptable.

La CK es un biomarcador de daño muscular muy sensitivo; pero, sólo los incrementos de miles a cientos de miles de U/L son considerados de importancia clínica (Raja *et al.*, 2011; Bernard, 2013), por ejemplo, de rabdomiólisis por ejercicio o distrofia muscular nutricional. La AST se encuentra también en la mayoría de células, tejidos u órganos suaves (músculo esquelético y cardiaco, hígado, riñón, eritrocitos (Raja *et al.*, 2011); su pico de actividad se presenta a las 12 h de ocurrido el daño al tejido, su T_{1/2} alcanza los 7 días (Bernard, 2013). En pruebas de endurance (100 km) regresó a sus valores basales 3 días después de concluida la carrera (Teixeira-Neto *et al.*, 2008). Por el contrario, la LDH presentó actividades superiores a las 450 U/L, a excepción de d 63 (391.8 ± 29.35 U/L). Sin embargo, la actividad de esta última es menos específica ya que sus 5 isoenzimas aparecen en varios órganos y tejidos (músculo esquelético y cardiaco, hígado, eritrocitos, páncreas, hueso, pulmón, leucocitos, trombocitos y nódulos linfáticos; Raja *et al.*, 2011). El

incremento de la actividad de LDH se asocia a problemas del músculo esquelético, cardíaco, hígado (Bernard, 2013), o a rhabdomiólisis, pero en este último caso, el aumento debe ser importante. LDH incrementa su actividad a las 12 h de ocurrido el daño, se mantiene elevada durante más tiempo que la CK y regresa a sus valores normales de 7 a 14 días de ocurrido el daño. En pruebas de endurance (Teixeira-Neto *et al.*, 2008), la actividad de LDH retomó sus valores basales, 3 días después de finalizada la prueba.

Los incrementos de la actividad de las enzimas en diferentes periodos pueden no compartir la misma causa, únicamente lo observado en 42d, momento en que CK y AST elevaron su actividad y corresponde al efecto de la actividad física. Los caballos experimentales, no realizaron ejercicio físico alguno los 30 días previos al inicio de este estudio; sin embargo, las actividades observadas para la CK no se elevaron sustancialmente, contrariamente a lo señalado por Harris *et al.* (1998) sobre los incrementos en la actividad de esta enzima debidos al desentrenamiento. Las actividades séricas de las tres enzimas estuvieron dentro de las reportadas para caballos sanos (cuadro 4.6) y muy próximas a las observadas por Muñoz *et al.* (2002) para caballos Andaluces en pruebas de ejercicio intenso antes y después de seis meses de entrenamiento y para potros árabes en pruebas estandarizadas de entrenamiento (Kedzierski *et al.*, 2009). También están muy próximas a lo observado en pruebas de endurance, donde los latidos cardiacos por minuto se mantuvieron en 60 (Teixeira-Neto *et al.*, 2008).

Como se comentó en el párrafo anterior, la causa del cambio en la actividad de las enzimas en los diferentes periodos fue diferente ¿Por qué se incrementó la actividad de CK, AST y LDH en d 21 y d 77 (periodos de adaptación, P1 y readaptación, P4, respectivamente)? Dentro de los ajustes realizados mencionados en el numeral 3.3, estuvo la disminución del alimento concentrado (de 4 a 2 kg/día) en P1, porque se observaron cambios conductuales (nerviosismo, ansiedad, agresividad) y dos casos de cólico (por acumulación de gases), además un caballo tuvo principios de laminitis, que fue tratada de inmediato y evolucionó satisfactoriamente. El incremento de las enzimas plasmáticas CK y AST puede reflejar la utilización de proteínas y el escape de enzimas a través de las membranas (Harris, 1998;

citado por Williams *et al.*, 2004) y otros sustratos para generar energía. En d 77 los animales regresaron al consumo inicial de 4 kg de concentrado por día. En un estudio complementario (Velázquez-Cantón *et al.*, 2018) donde se cuantificó el lactato sanguíneo se observaron incrementos en las concentraciones del analito que coinciden en tiempo con el de las enzimas. Este comportamiento del lactato fue explicado por la elevada cantidad de concentrado que los animales estaban consumiendo. No se pudo cuantificar si el D-lactato era el isómero predominante; sin embargo, la signología de laminitis en un caballo, apoya a que esta es la hipótesis correcta. Si bien, se indica (Aksenov *et al.*, 2000) que la mayor actividad de CK es en el músculo esquelético, también se encuentra en el músculo liso. La AST también se incrementa ante un daño a otros tejidos suaves diferentes al músculo estriado (Harris *et al.*, 1998). En lo referente a LDH, ésta cataliza la conversión de piruvato a lactato en una amplia variedad de tejidos. Keller *et al.* (1985) en un estudio comparativo de la distribución de las enzimas con utilidad diagnóstica en animales de zoológico y domésticos señalan para el caballo una actividad sérica relativa de 0.1 para AST y 0.2 para LDH de origen intestinal, siendo la actividad del hígado la unidad de referencia [=1].

Dado que el comportamiento de las tres enzimas siguieron trayectorias similares (figura 4.6), y de acuerdo con los resultados observados en la matriz de correlaciones, se realizaron los análisis de regresión para los días experimentales, encontrando asociaciones significativas ($P < 0.05$) entre las actividades de las enzimas en diferentes días experimentales (cuadro 4.7).

Si bien, el incremento en suero de la actividad de las tres enzimas CK, AST y LDH se asocia al daño muscular, la asociación de CK con las dos últimas no siempre se ha consignado (Marlin *et al.*, 2002). Las relaciones presentadas en el cuadro 4.7 son todas positivas, lo que va en el mismo sentido de las observaciones clínicas cuando las actividades de las enzimas se incrementan en respuesta al ejercicio por un aumento en la permeabilidad de la membrana (Kingston, 2008). Harris *et al.* (1998) mencionan que el incremento de la CK en caballos que han suspendido su entrenamiento, es más importante respecto al observado en los animales entrenados ante el mismo ejercicio (tipo, duración e

intensidad). Por otra parte, aunque los incrementos hasta de 5 veces el valor basal en CK (Volfinger *et al.*, 1994) pueden ser estadísticamente significativos, no necesariamente son de importancia clínica (Freestone *et al.*, 1989), si bien se asocian al daño muscular no indican directamente que haya habido daño al músculo esquelético (Manfredi *et al.*, 1991), pueden elevarse por cambios en la permeabilidad del sarcolema.

Cuadro 4.7 Asociaciones entre las actividades séricas de creatina quinasa (CK) y aspartato amino transferasa (AST) en caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado

Día	Ecuación	Valor de P	s	r ² ajustado	r ² predicción
35	CK (U/L) = 39.7 + 0.477 AST U/L	<0.001	33.34	40.97	36.96
63	CK (U/L) = 56.1 + 0.406 AST U/L	0.001	19.08	31.19	29.72
77	CK (U/L) = 66.6 + 0.509 AST U/L	<0.001	28.86	42.04	36.42

Las asociaciones encontradas se presentan en tres momentos importantes del tiempo experimental: 1) al día 35 coincidiendo con el término de la primera semana de ejercicio físico, 2) al día 63 al retirar la complementación Se-E y 3) al final del experimento d 77 cuando las diferentes variables de respuesta se elevaron. Otro aspecto importante a señalar son los coeficientes de determinación (r²) para las asociaciones entre las actividades de CK y AST cuyo valor de r² para predicción fue \approx 30 %. La CK y AST están relacionadas con el esfuerzo metabólico, la utilización proteínica y la obtención de energía. En cuanto a los días donde se presentaron las relaciones se explican, en el caso de d 35 por la ausencia previa del ejercicio (Moreno Escobar, 2013) y en d 77 porque los animales regresaron al manejo cotidiano otorgado en la UPMM y que de acuerdo con los resultados de COR estaban bajo estrés constante. Las relaciones observadas entre las actividades de CK y AST, los días 35 y 77 fueron afectadas (P < 0.001) por el nivel de la vitamina E (cuadro 4.8). *Grosso modo*,

las ecuaciones muestran que la constante para CK es mayor en ausencia de AST, en los animales que recibieron durante el periodo de complementación (P1, P2 y P3) 2.0 UI E/kg PV; es decir 3.23 y 1.99 veces más respecto a los caballos que recibieron 1.6 UI E/kg PV, para d 35 y d 77, respectivamente. Esto disiente con diferentes trabajos, donde la complementación con altas dosis de vitamina E disminuye las actividades enzimáticas de CK (Wilson *et al.*, 1976; Williams *et al.*, 2005; Williams y Carlucci, 2006) y AST (Wilson *et al.*, 1976; Williams *et al.*, 2005). Ésta discrepancia requiere mayor investigación.

Cuadro 4.8 Asociaciones entre las actividades séricas de creatina quinasa (CK), aspartato amino transferasa (AST) y complementación con vitamina E en caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado

E UI/kg PV	Ecuación	Valor de P	s	r ² ajustado	r ² predicción
Día 35					
1.6	CK (U/L) = 13.7 + 0.51 AST U/L	<0.001	30.03	52.11	45.76
2.0	CK (U/L) = 44.3 + 0.51 AST U/L				
Día 77					
1.6	CK (U/L) = 31.2 + 0.58 AST U/L	<0.001	24.74	57.43	48.28
2.0	CK (U/L) = 62.1 + 0.58 AST U/L				

Al término del periodo experimental (d 77), el retorno a las condiciones de manejo cotidiano de la UPMM, pueden ser consideradas como de demanda metabólica importante, según se observa en las relaciones entre las variables de respuesta (cuadro 4.9). En la ecuación 1 se aprecia la relación directa entre las actividades de AST y de la CK, ambas

asociadas al daño muscular; y con la LDH relacionada al metabolismo anaeróbico, además la relación con el MDA. En tanto en la segunda ecuación, la relación directa se estableció entre la AST con CK y LDH, en tanto la concentración sanguínea de Se (BSe) fue una relación inversa, es decir a mayor cantidad de Se en sangre, se predice menor actividad de la AST.

Cuadro 4.9 Asociaciones presentadas en el día 77 de experimentación entre las variables sanguíneas de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Ecuación		Valor de P	s	r ² ajustado r ² predicción
1	AST U/L = -12.5 + 0.564 CK /L + 0.125 LDH U/L + 116.3 MDA ng/mL	<0.001	30.66	61.92 51.16
2	AST U/L = 157.3 + 0.380 CK U/L + 0.181 LDH U/L - 0.840 BSe ng/mL	<0.001	29.32	65.19 57.04

4.5 ENZIMAS DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE: SUPERÓXIDO DISMUTASA, SOD Y GLUTATIÓN PEROXIDASA, GPX

En el cuadro 4.10 se presentan los resultados correspondientes a las enzimas antioxidantes eritrocitarias: súper óxido dismutasa, SOD y glutatión peroxidasa, GPx. Para el caso de la primera, sólo se observó el efecto significativo para el tiempo ($P < 0.001$), es decir ni Se, ni E, ni su interacción y tampoco sus interacciones con el tiempo, resultaron significativas ($P > 0.05$). En primer lugar, se presentan y discuten los resultados de la enzima superóxido dismutasa y en segundo término lo referente a la glutatión peroxidasa.

Cuadro 4.10 Actividad eritrocitaria de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con selenio (seleno-levadura) y vitamina E (DL- α -tocoferol)

Ítem	MEDIAS MÍNIMO CUADRÁTICAS				EEM	Valor de <i>P</i>						
	LSeLE ¹ (n = 6)	HSeLE ² (n = 6)	LSeHE ³ (n = 6)	HSeHE ⁴ (n = 6)		Se	E	Se × E	d	d × Se	d × E	d × Se × E
SOD (U/mL)	66.65	63.86	62.77	60.43	3.13	0.257	0.422	0.944	<0.001	0.692	0.578	0.423
GPx (U/L)	1229.06	1180.83	1312.08	1456.87	85.55	0.049	0.579	0.273	<0.001	0.274	0.054	0.002

¹LSeLE, 0.1 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

²HSeLE, 0.3 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

³LSeHE, 0.1 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

⁴HSeHE, 0.3 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

EEM, error estándar de la media

d, día

Las enzimas eritrocitarias que contribuyen a contrarrestar los efectos de los radicales libres son:

❖ La catalasa (EC 1.11.1.6) que se encuentra en micro gránulos en los eritroblastos, que van desapareciendo en el proceso de maduración. En el eritrocito, la catalasa está dispersa en el citosol (Maral *et al.*, 1977).

❖ La superóxido dismutasa o eritrocupreína (SOD, EC 1.15.1.1) que es una enzima citosólica eritrocitaria (Maral *et al.*, 1977).

❖ La glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) está ligada a la membrana del glóbulo rojo (Torres-Ramos *et al.*, 2009), o al menos muy cercana a la misma y es considerada la principal enzima antioxidante para destruir al H₂O₂ (Nagababu *et al.*, 2003; Torres-Ramos *et al.*, 2009) ya que la catalasa eritrocitaria tiene menor afinidad por el peróxido. La GPx sanguínea es un indicador adecuado del *status* de Se en caballos (Caple *et al.*, 1978).

Cabe señalar que los valores promedio de la actividad de la SOD, para todos los grupos experimentales y a través del tiempo estuvieron dentro de lo consignado en la literatura (cuadro 4.11) para actividades expresadas por litro de sangre. En este punto, se debe observar que algunos trabajos (Andriichuk *et al.*, 2014; Ememe *et al.*, 2015; Andriichuk *et al.*, 2016) presentan valores menores de la actividad, tanto para SOD como para GPx antes y después del ejercicio físico realizado. Si bien, la metodología de medición es diferente, la variación reportada entre los diferentes estudios es muy amplia.

En la figura 4.7, se aprecia el comportamiento de la actividad de SOD en el periodo experimental. El valor basal (0d) de SOD fue de 44.50 U/mL, estableciéndose una diferencia de 1.74 veces entre 0d y la media obtenida para los días 42 a 56 (77.61 U/mL ± 3.62 EEM) correspondientes al periodo de actividad física (P2) y de 1.59 veces con la del día 63 (71.00 U/mL ± 4.85 EEM). La diferencia entre el valor basal y P2 se atribuye a la

realización del ejercicio físico. En P3, la actividad de SOD mostró un valor que puede ser calificado de intermedio, ya que no fue diferente de la actividad basal (0d) y lo observado en P4. Algunos investigadores señalan que en ratas (Veera *et al.*, 1992; Akil *et al.*, 2011), los incrementos en SOD están en función de la intensidad de la actividad física realizada.

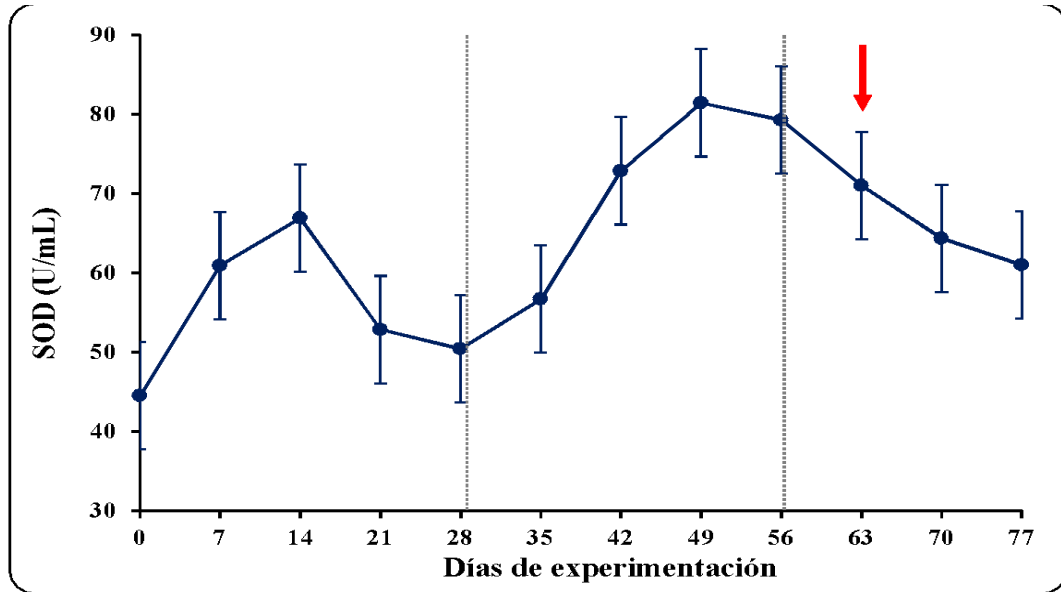


Fig. 4.7

Promedio de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

Los valores consignados en la literatura para SOD antes y después del ejercicio (cuadro 4.11) muestran aumentos desde 1.35 a 1.87 veces; incrementos similares a los observados en el presente estudio. Kirschvink *et al.* (2006) mencionan que la actividad de la SOD está condicionada por factores propios del animal (raza, sexo, edad y tipo de ejercicio físico: intensidad y tiempo de duración).

Cuadro 4.11 Actividad sérica de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en equinos sanos.

Autor	Actividad física			
	Sin o anterior		Después	
	SOD (U/mL)	GPx (U/L)	SOD (U/mL)	GPx (U/L)
Maral <i>et al.</i> (1977)	330	-----	-----	-----
Smith <i>et al.</i> (1983)	50 – 200	-----	-----	-----
Calamari <i>et al.</i> (2009) ¹	-----	23 085	-----	-----
El-Deeb y El-Bahar (2010)	110	-----	-----	-----
Andriichuk <i>et al.</i> (2014)	15 – 17	1610 – 2230	25 – 28	1120 – 1740
Ememe <i>et al.</i> (2015)	2.10 – 2.28	35.83 – 39.17	-----	-----
Andriichuk <i>et al.</i> (2016) ²	12.70	0.84	17.19	0.88
Andriichuk <i>et al.</i> (2016) ³	16.39	2.69	26.88	1.70

¹ Caballos no suplementados

² Warmblood ucraniano

³ Holsteiner

El efecto de la actividad física en el incremento de la actividad de la SOD ha sido reportado (Lamprecht y Williams, 2012), lo que implicaría un incremento en la producción del anión superóxido por el ejercicio realizado. En competencias de salto efectuadas en condiciones tropicales, donde los caballos no recibieron antioxidantes, se observó que la actividad de la SOD eritrocitaria, incrementó 1.59 veces 24 h después del evento, lo que se explicó en función de los oxidantes generados (Soares *et al.*, 2011). Akil *et al.* (2011) trabajando con ratas complementadas con Se (Na₂SO₃; 6 mg/kg/día), sometidas a un ejercicio agudo de natación observaron un menor incremento de lactato; pero mayor aumento en las actividades de los antioxidantes: glutatión, SOD y GPx, respecto a grupos controles (sin actividad y sin complementación). En sentido opuesto, en ciclistas de élite se

observó que después de dos meses de complementación con vitaminas E (400 mg/día) y C (500 mg/día), las actividades de SOD en suero disminuyeron (de 14.60 a 13.24 U/mg proteína), mientras que las de la catalasa aumentaron (de 53.00 a 65.23 μ moles de H₂O₂/mg proteína/min) (Gupta *et al.*, 2009). En otro estudio en equinos (Ono *et al.*, 1990), la actividad eritrocitaria de la SOD no se afectó por el ejercicio físico, ante la utilización intramuscular de Se-E, así como su suplementación tampoco afectó el desempeño físico (Lamprecht y Williams, 2012). De Moffarts *et al.* (2005) reportaron que en caballos suplementados con Se, el uso del sistema GPx parece privilegiarse respecto al SOD. Como ya se mencionó, en el eritrocito la principal enzima antioxidante es la GPx, aunado al sistema de bombeo de anión superóxido que tiene esta célula (Raftos *et al.*, 2010) que contribuye a disminuir las concentraciones intra eritricitarias del anión.

El valor global de la actividad de la GPx eritrocitaria fue afectado ($P = 0.049$) por el nivel de Se; es decir, el grupo de doce caballos que recibió 0.3 mg/kg MS presentó una mayor actividad ($P < 0.049$), respecto al grupo que recibió 0.1 mg/kg MS (1384.48 vs 1209.94 U/L \pm 60.49 EEM; respectivamente). La actividad de la GPx también fue afectada por el día experimental ($P < 0.001$) (figura 4.8 A). En la figura 4.8 A, se puede apreciar que entre los días 0, 7, 14, 21, 63, 70 y 77 no se presentaron diferencias ($P > 0.05$) ni entre los tratamientos, ni entre los días de experimentación (1105.71 U/L; EEM, 21.75). Pero, a partir del día 21, donde las líneas de los cuatro tratamientos convergieron, la actividad de la enzima comenzó a presentar variaciones entre los tratamientos durante el periodo de ejercicio físico, correspondiendo al efecto ($P = 0.002$) de la triple interacción Se \times E \times d (figura 4.8 B). En contraste, White y Warren (2017) observaron en caballos cuarto de milla, el efecto ($P < 0.05$) del ejercicio en la actividad de la GPx intramuscular; sin embargo, no observaron el efecto ($P > 0.05$) de la dosis de complementación con Se (0.1 vs 0.3 mg Se/kg MS).

Las variaciones en la actividad de la GPx eritrocitaria a partir de d 21, acompañaron a cambios en el indicador de peroxidación lipídica: MDA, además de las actividades de las

enzimas asociadas al daño muscular (véase 4.2.2 y 4.4, respectivamente). Los análisis de regresión encontraron asociaciones entre GPx, MDA y Se en sangre:

$$\text{GPx} = 302.33 + 941.08 \text{ MDA} + 3.09 \text{ Se} \quad \text{P} = 0.002 \quad \text{s} = 224.03 \quad r^2 \text{ ajustado} = 38.60$$

Además, se encontró la asociación entre GPx, con el Se sanguíneo y se observó una tendencia ($P < 0.10$) con la actividad de LDH:

$$\text{GPx} = 950.04 + 3.80 \text{ Se} - 5.30 \text{ LDH} \quad \text{P} = 0.001 \quad \text{s} = 245.30 \quad r^2 \text{ ajustado} = 26.40$$

La actividad de la GPx en d 21 estuvo directamente asociada ($P = 0.013$) con la concentración sanguínea de Se (r^2 ajustado = 20.00). Esta relación fue observada también por Maylin *et al.*, (1980) en caballos del estado de Nueva York; y Calamari *et al.* (2009), en este caso, la relación fue afectada por la fuente utilizada de Se como complemento (Na_2SeO_3 vs Se-levadura) pero no, por la dosis de Se. El coeficiente de correlación fue alto ($P < 0.001$; $r = 0.94$ y 0.86 , Maylin *et al.*, 1980 y Calamari *et al.*, 2009, respectivamente) en esos trabajos. Para el análisis de correlación, Calamari *et al.* (2009) utilizaron todos los datos de su estudio, el cual tuvo una duración de 112 días; sin embargo, no mencionaron el tipo de actividad física realizada. Mientras que, en el presente trabajo, la relación fue detectada como ya se mencionó, para d 21; como puede observarse en la figura 4.8 A, en ese punto, las actividades de la GPx se “unificaron”, además, las concentraciones sanguíneas de Se cuantificadas fueron mayores a 100 ng/mL (véase 4.3.2); MDA descendió en comparación con la elevación mostrada en d 7. La relación directa ($P < 0.05$) observada entre GPx, MDA y Se, explica el descenso en la actividad de GPx en d 21.

Una pregunta que se genera es ¿por qué la actividad de la GPx no incrementó en d 7, cuando la elevación de MDA observada fue importante? Los estudios realizados en 1983 (Ronéus y Lindholm citado por Calamari *et al.*, 2009a), señalan que se necesitan 21 días para que la complementación con Se afecte la actividad de la enzima. El comportamiento observado (figura 4.8 A) para la actividad de la GPx, dónde los cuatro tratamientos no

responden a la elevación de MDA en 7d y se juntan en 21d, cuando las concentraciones de MDA descendieron; éstos resultados apoyan la afirmación de que son necesarios 21 días de administración oral, en este caso de Se-levadura para que la complementación con Se, incida en la actividad de GPx en caballos que realizan una mínima actividad. Es necesario recordar que los caballos experimentales estaban en deficiencia subclínica de Se (<50 ng/mL, véase 4.3.2).

Calamari *et al.* (2009) mencionan que el destino del Se ingerido varía de acuerdo con su naturaleza. Así, el Se-inorgánico es poco absorbido y retenido; éste último se incorpora a las Se-enzimas. Los eritrocitos incorporan selenio inorgánico que es reducido a seleniuro de hidrógeno (H₂Se) por el glutatión y lo regresan al plasma así, en forma reducida donde se une a las proteínas plasmáticas (principalmente albúmina) y es transportado al hígado para ser parte de las reservas de Se para la formación de selenoproteínas. Alguna cantidad es transportada al riñón para eliminarse con la orina (Pagan *et al.*, 1999). En el caso del selenito, no absorbido o no metabolizado se pierde con las heces y orina, respectivamente (Weiss, 2005). Por otra parte, el Se orgánico absorbido, viaja por el torrente sanguíneo utilizando los mecanismos de los aminoácidos (Pagan *et al.*, 1999), sirve para la síntesis de proteínas sustituyendo a la Met (Weiss, 2005; Calamari *et al.*, 2009a); en este caso la mitad de Se-Met puede ser removida, el resto es reducida a selénido (H₂Se) y utilizada para la síntesis de Se-Cys, que se incorpora al sitio activo de las selenoenzimas (Calamari *et al.*, 2009a).

La actividad de GPx incrementó en d 28 (figura 4.8 B), para mantenerse alta (respecto a los otros periodos) durante todo el ejercicio (P2); en los diferentes días de este periodo se observó lo siguiente:

❖ d 35, la actividad de la GPx, en los grupos experimentales que recibieron 0.1 mg Se/kg MS (LSeLE y LSeHE, 1535.80 U/L ± 86.10 EEM) fue menor (P < 0.05) respecto a los del grupo HSeHE (1869.00 U/L ± 106.00 EEM). El grupo HSeLE, no fue diferente (P > 0.05; 1638.00 U/L ± 126.00 EEM) de los otros grupos experimentales.

❖ d 42, la actividad de la GPx, en el grupo LSeHE fue menor que en el grupo HSeHE ($P < 0.05$; $1563.80 \text{ U/L} \pm 68.00 \text{ EEM}$ vs $1955.00 \text{ U/L} \pm 112.00 \text{ EEM}$, respectivamente). En tanto, los grupos que recibieron 1.6 UI E/kg PV (LSeLE y HSeLE, $1745.00 \text{ U/L} \pm 78.30 \text{ EEM}$) no fueron diferentes ($P > 0.05$) de los ya mencionados.

❖ d 49, la actividad de la GPx, en los grupos experimentales que recibieron 0.1 mg Se/kg MS (LSeLE y LSeHE, $1500.30 \text{ U/L} \pm 73.70 \text{ EEM}$) fue menor respecto al grupo HSeHE ($1862.40 \text{ U/L} \pm 77.60 \text{ EEM}$). El grupo HSeLE, no fue diferente ($P > 0.05$; $1598.00 \text{ U/L} \pm 117.00 \text{ EEM}$) de los otros tres grupos.

❖ d 56, la actividad de la GPx, no fue diferente ($P > 0.05$; $1587.70 \text{ U/L} \pm 52.30 \text{ EEM}$) entre los cuatro grupos experimentales.

La figura 4.8 B muestra el comportamiento de los cuatro grupos experimentales en P2; en general, en los tratamientos LSeHE y HSeLE no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en la actividad de la GPx, dentro, ni entre ellos ($1615.50 \text{ U/L} \pm 32.20 \text{ EEM}$). Esto implica un efecto predominante del Se en la actividad de la enzima. Sin embargo, la actividad de la GPx de los tratamientos LSeLE y HSeHE, fueron diferentes ($P < 0.05$) en los días 42 y 56 (LSeLE, 1743.33 vs 1318.33 U/L ; HSeHE, 1954.80 vs 1705.20 U/L ; para d 42 y d 56, respectivamente). Cabe señalar que los caballos del tratamiento LSeHE respondieron al desafío del ejercicio; de modo que en d 42 la actividad de su GPx no fue diferente ($P > 0.05$; $1815.44 \text{ U/L} \pm 66.63 \text{ EEM}$) del grupo HSeLE. Kirschvink *et al.* (2006), mencionan que, el estado oxidante/antioxidante de la sangre de los caballos es afectado por la raza, género y edad; por otra parte reportan la relación sinérgica entre GPx, Se y vitamina E. Sin embargo, en el presente estudio la suplementación con DL- α -tocoferol no tuvo efecto ($P > 0.05$). Lang *et al.* (1987) observaron en ratas la capacidad de compensar la deficiencia de Se con un efecto mínimo en el desempeño, lo que atribuyeron a la presencia de otros antioxidantes.

La base de la interacción $Se \times E \times d$, para la actividad de la GPx, radica en el papel conjunto de ambos micro nutrientes en la protección de las membranas celulares (Smarsh y Williams, 2017). Efecto que fue evidente en la etapa de mayor desafío por la actividad física realizada. De este modo, la actividad de la GPx en los caballos que recibieron 0.1 mg de Se/kg MS y 2 UI de vitamina E (LSeHE), no fue diferente ($P > 0.05$), respecto a los caballos que recibieron 0.3 mg de Se/kg MS y 1.6 UI de vitamina E (HSeLE). En el numeral 4.2.3 se discuten las interacciones fisiológicas de ambos micro nutrientes (selenio y vitamina E) que contrarrestan a los oxidantes formados a continuación del estallido respiratorio (*véase figura 2.3*).

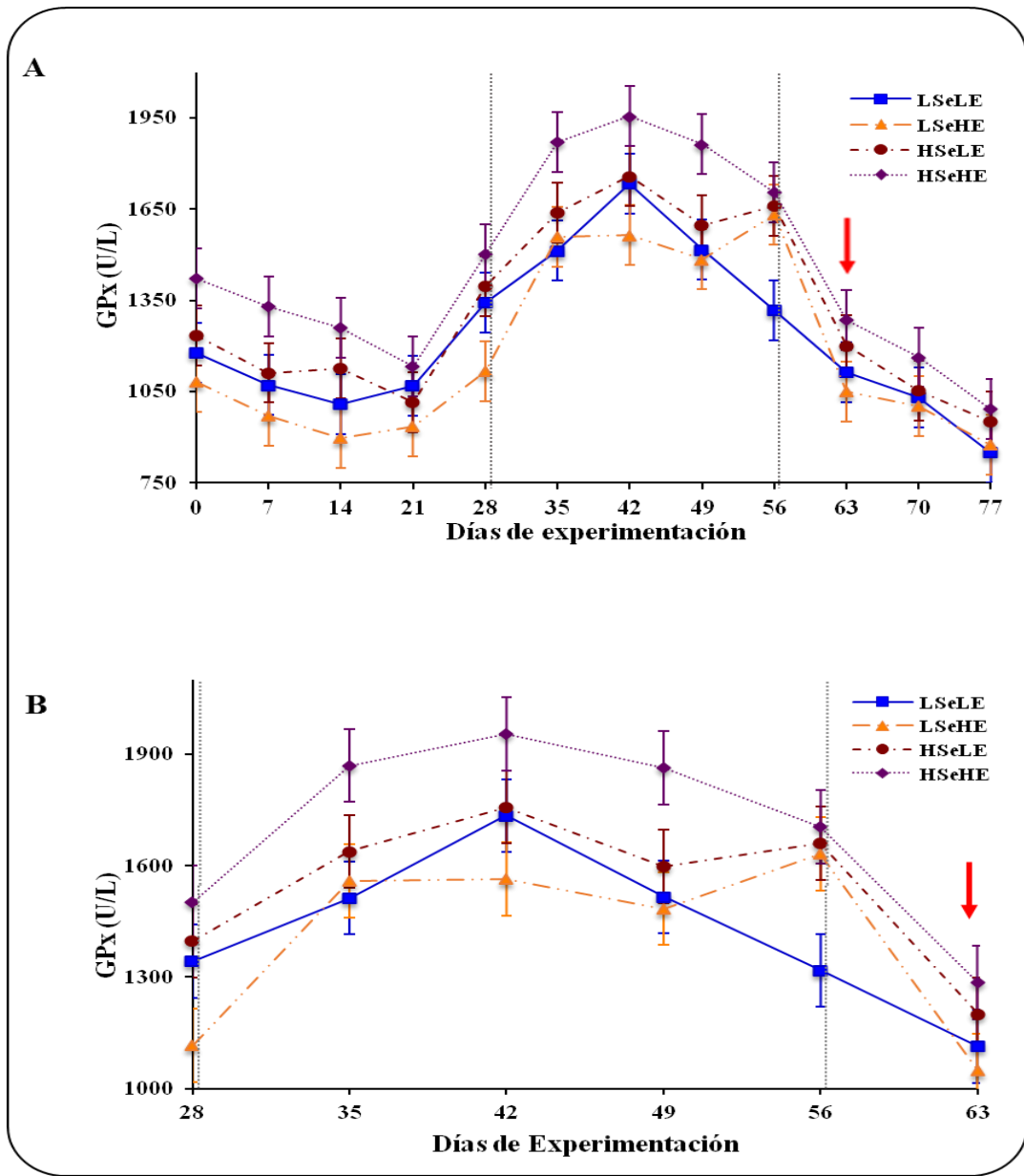


Figura 4.8

Actividad de la glutación peroxidasa (GPx) eritrocitaria en sueros de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, LSe, 0.1 y HSe, 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, LE, 1.6 y HE, 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media. (A) Actividad de la GPx durante todo el periodo experimental; (B) Actividad de la GPx durante el periodo de actividad física, hasta la suspensión de la doble complementación.

La GPx es el antioxidante más activo para los eritrocitos y es rápidamente afectado por la deficiencia de Se (Fairweather-Tait *et al.*, 2010) y por la generación de peróxidos debida al incremento en la actividad de SOD (Lamprecht y Williams, 2012). El comportamiento observado entre Se en sangre y la GPx en el periodo de actividad física (P2) ha sido también observado en atletas humanos (Laaksonen *et al.*, 1999). Maylin *et al.* (1980) y Knight y Tyznik (1990) mencionan que se requieren entre 35 y 49 días para aumentar de forma importante la actividad de la GPx; también, Smarsh y Williams (2017) observaron la respuesta en la actividad de la GPx a los 49 días de complementación. Calamari *et al.* (2009) observaron que en el plasma, la meseta de la concentración de Se fue alcanzada entre 75 y 90 días; pero, en la sangre total se alcanzó hasta después de 120 días de complementación con Se-levadura o Na₂SeO₃. Por lo que, en este trabajo, el incremento observado en la actividad de la GPx a partir de d 28, que si bien, se acopló con la mayor concentración de Se en sangre total (*ver 4.3.2*); no se puede atribuir únicamente a un aumento en la incorporación del Se a la enzima durante su síntesis, ya que ésta se lleva a cabo durante la eritropoyesis, cuya duración es de 5 a 7 días en el caballo; pero en condiciones de alta demanda puede realizarse en dos días (Geor, 2000). Sin embargo, la vida media de los hematíes equinos varía de 140 a 150 días (Schalm y Carlson, 1982); con una tasa de recambio celular del 1 % cada 24 horas (Knight y Tyznik, 1990). Así, la elevación en la actividad de GPx en P2, se atribuye a la respuesta del eritrocito ante los procesos oxidativos provocados por el ejercicio, aunque este haya sido moderado. La relación GPx eritrocitaria con la actividad física ha sido reportada (Williams *et al.*, 2004) en algunos estudios; mientras que en otros no se ha observado (Brady *et al.*, 1978; Gallagher y Stowe, 1980; Ono *et al.*, 1990) atribuyendo el resultado a un escape de la enzima desde el eritrocito hacia el plasma. La actividad enzimática depende también de la disponibilidad de sustrato (glutación); la complementación con Se-levadura o Na₂SeO₃, incrementa las concentraciones sanguíneas de Se-Cys, llegando a representar hasta el 79.1 % del Se total (Calamari *et al.*, 2009 b). El incremento en la Se-Cys favorecería la concentración de glutación eritrocitaria, dado que la Cys es utilizada por los eritrocitos para la síntesis de este antioxidante (Raftos *et al.*, 2010); sin embargo, la actividad de GPx disminuye con la edad de la célula y del individuo (Smarsh y Williams, 2017). Por lo que

se refiere a la síntesis del glutatión, ésta no se ha dilucidado totalmente, se han elaborado modelos para el ser humano (figura 4.9; Raftos *et al.*, 2010); pero, en caballos la información es escasa. En ratones y ratas se ha demostrado (Krejsa *et al.*, 2010) que los EROs activan la glutatión-cisteína ligasa (GCL), facilitando la formación de la holoenzima. En caballos PSI (Park *et al.*, 2017), la GCL podría ser activada en el músculo esquelético y en los leucocitos sanguíneos como respuesta a los EROs generados por el ejercicio.

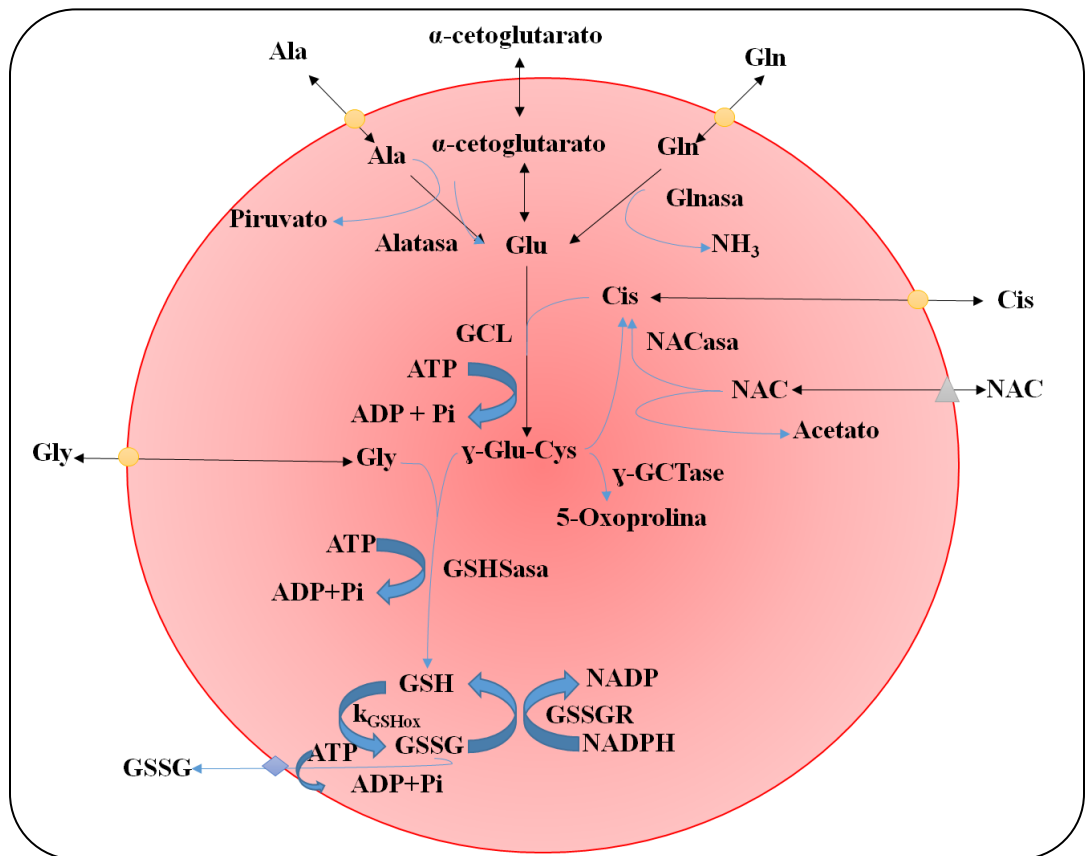


Figura 4.9 Modelo de reacciones metabólicas en el eritrocito humano. Glnasa, glutaminasa; Alatasa, alanina aminotransferasa; NACasa, N-acetilcisteína deacetilasa; GSHasa, glutatión sintetasa; γ -GCTasa, γ -glutamyl ciclotransferasa. ●, transportador de membrana para aminoácidos; ▲, proteína de intercambio aniónico para el transporte de N.acetil cisteína; ◆, proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos (MPR1) para la exportación de glutatión oxidado (GSSG). (Modificado de Raftos *et al.*, 2010).

El resultado observado hacia el final del periodo de ejercicio físico (días 49 y 56), donde la actividad de la GPx desciende paulatinamente, se explica por el entrenamiento que representó la actividad realizada los días anteriores. De Moffarts *et al.* (2004) indican que el entrenamiento y la intensidad de la actividad influyen los marcadores antioxidantes en la sangre de caballos sanos. Smarsh y Williams (2017), compararon el status antioxidante y el estrés oxidativo en potras de un año de edad y en yeguas adultas, observando cambios en las primeras etapas de entrenamiento; sin embargo, al final del mismo no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre las edades en las variables asociadas a los antioxidantes.

Con base en el efecto de la triple interacción ($Se \times E \times d$), se realizaron análisis de regresión utilizando valores estandarizados para conocer el comportamiento de las pendientes, en la fase ascendente de d 21 a d 42 (cuadro 4.12) y en la fase descendente (d 42 a d 77) cuyos resultados se presentan más adelante (cuadro 4.13).

Cuadro 4.12 Asociaciones entre el tiempo (días, 21 al 42) y la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) eritrocitaria en caballos complementados con seleno-levadura y DL- α -tocoferol sometidos a ejercicio moderado

Tratamiento	Ecuación	Valor de P	s	r ² ajustado
LSeLE ¹	GPx = 438.90 + 0.966 × día	0.004	30.91	99.00
LSeHE ²	GPx = 245.65 + 0.946 × día	0.054	126.69	84.10
HSeLE ³	GPx = 341.37 + 0.973 × día	0.027	92.97	91.20
HSeHE ⁴	GPx = 338.76 + 0.971 × día	0.029	109.84	91.50

¹LSeLE, 0.1 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

²HSeLE, 0.3 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

³LSeHE, 0.1 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

⁴HSeHE, 0.3 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

Como se observa en el cuadro 4.12, las asociaciones de la fase ascendente (d 21 a d 42) para los tratamientos LSeLE, HSeLE y HSeHE con los días experimentales fueron significativas ($P < 0.05$); pero solo hubo una tendencia ($P = 0.054$) para el tratamiento LSeHE. En la fase descendente (d 42 a d 77; cuadro 4.13), las asociaciones de los cuatro tratamientos fueron significativas ($P < 0.05$). Las pendientes presentan un valor muy cercano para el ascenso y descenso en la actividad de la enzima.

Cuadro 4.13 Asociaciones entre el tiempo (días, 43 al 77) y la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) eritrocitaria en caballos complementados con seleno-levadura y DL- α -tocoferol sometidos a ejercicio moderado

Tratamiento	Ecuación	Valor de P	s	r ² ajustado
LSeLE ¹	GPx = 2884.82 – 0.988 × día	< 0.001	56.70	97.00
LSeHE ²	GPx = 2712.55 – 0.879 × día	< 0.001	175.04	71.60
HSeLE ³	GPx = 3004.01 – 0.946 × día	< 0.001	124.35	86.90
HSeHE ⁴	GPx = 3448.06 – 0.974 × día	< 0.001	100.92	93.70

¹LSeLE, 0.1 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

²HSeLE, 0.3 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

³LSeHE, 0.1 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

⁴HSeHE, 0.3 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

Este descenso en la actividad, de aproximadamente 1 U/L por cada día (de d 42 a d 77) puede explicarse por el efecto del entrenamiento (para d 49 y d 56) y por el cese de la actividad (d 63). Además, la actividad de la GPx eritrocitaria no se relaciona linealmente con el consumo de Se y tiende a alcanzar la meseta con altos consumos del nutrimento (Blackmore *et al.*, 1982). Al final del experimento (d 77), la actividad de la GPx no fue diferente ($P > 0.05$) entre todos los grupos, en este momento se detectó la correlación con las concentraciones de Se ($r = 0.54$; $P = 0.007$); indicando que el descenso de la actividad de la GPx está relacionado con el descenso de las concentraciones sanguíneas de Se. Este

resultado es indicador de que la complementación y el tiempo durante el cual ésta fue proporcionada, no fue suficiente para que los caballos pudieran alcanzar sus niveles considerados como normales, lo que no concuerda con White y Warren (2017) quienes observaron que caballos que recibieron una dosis de 0.3 mg/kg MS pudieron mantener la actividad elevada de la GPx, ocho semanas después de la reducción de la complementación con Se a 0.1 mg/kg MS.

4.6 METALES DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE: ZINC Y COBRE

4.6.1 DIETA

Los contenidos de zinc y cobre de la dieta fueron 48.77 y 6.86 mg/kg MS respectivamente, ambos estuvieron próximos a los valores recomendados para caballos adultos efectuando actividad:

KER⁶: Zn, 40 – 60; Cu, 10 – 14 mg/kg MS (Pagan, 2000).

Sistema GfE⁷: Zn, 1mg /kg PV; Cu, 0.1 mg/kg PV (Wichert *et al.*, 2002).

Sistema NRC: Zn, 40; Cu, 10 mg/kg MS (NRC, 2007).

Sistema INRA: Zn, 50; Cu, 10 mg/kg MS (Martin-Rosset, 2012).

De modo que se ofrecieron a los caballos 453.56 y 63.80 mg/kg MS de Zn y Cu respectivamente. El NRC (2007) consigna que disminuir la relación Zn : Cu a 3, mejora problemas de osteocondrosis en animales jóvenes; aunque también menciona que los caballos pueden tolerar relaciones hasta de 32.5 (250.0 : 7.7); pero, relaciones de 129.87 ya generan problemas de hipocuprosis en el caballo (1000 : 7.7). En este estudio, la relación Zn : Cu fue de 7.1. Los caballos a diferencia de los rumiantes, toleran hasta 250 mg Cu/kg MS; por ejemplo, los ovinos toleran 15 mg Cu/kg MS (NRC, 2006). El zinc y el cobre son antagonicos del Mo, S, Se, Cd, Fe y Pb (Suttle, 2010). Morales Almaraz *et al.* (2007) mencionan que la absorción de Zn incrementa con los contenidos bajos de Zn en la dieta.

⁶ KER, Kentucky Equine Research.

⁷ GfE, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, Sociedad de Fisiología Nutricional (Alemania).

Pagan (2000) reporta una relación directa entre la retención de Zn (y , mg/dL) y su consumo (x , mg/d) [$y = -52.503 + 0.2119x$; $R^2 = 0.6049$], en una región de exploración entre 118.8 y 1021.78 mg Zn ingeridos. Se han emitido recomendaciones alimentarias de relaciones hierro : cobre : zinc, de 4:1:3 (NRC, 2007); o hierro : cobre : zinc : manganeso, de 1:1:3:3, o bien una relación cobre : zinc : manganeso de 1:5:5 (Skripnichenko, 1980). En México, tanto los suelos como los forrajes son considerados como carentes en Cu y Zn (Morales Almaraz *et al.*, 2007) y abundantes en hierro.

Wichert *et al.* (2002) observaron que caballos que consumieron raciones deficientes en Zn y/o Se, no presentaron deficiencias de esos elementos; en su estudio, mostraron que los animales que recibieron una dieta con 21 mg Zn/kg MS, no mostraron deficiencias clínicas del elemento, por lo que la recomendación de NRC emitida en 1989 (40 mg Zn/kg MS) y confirmada en 2007, puede estar sobrestimada.

4.6.2 SANGRE

El cuadro 4.14 presenta los resultados del análisis estadístico para las concentraciones sanguíneas de zinc y cobre.

En el caso de las concentraciones sanguíneas de Zn, estas mostraron el efecto del tiempo ($P < 0.001$) y la tendencia ($P = 0.095$) para ser afectadas por la interacción Se \times d. En tanto las concentraciones de Cu fueron afectadas sólo por el tiempo ($P < 0.001$).

Cuadro 4.14 Actividad eritrocitaria de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en caballos sometidos a actividad física moderada, complementados con seleno-levadura (Se) y DL- α -tocoferol (E)

Ítem	MEDIAS MÍNIMO CUADRÁTICAS				EEM	Valor de <i>P</i>						
	LSeLE (n = 6)	HSeLE (n = 6)	LSeHE (n = 6)	HSeHE (n = 6)		Se	E	Se × E	d	d × Se	d × E	d × Se × E
Zinc ($\mu\text{g/mL}$)	4.133	3.903	3.896	4.150	0.138	0.932	0.971	0.095	<0.001	0.602	0.734	0.300
Cobre ($\mu\text{g/mL}$)	1.070	1.127	1.071	1.125	0.063	0.387	0.996	0.975	<0.001	0.998	0.682	0.200

¹LSeLE, 0.1 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

²HSeLE, 0.3 mg Se/kg de MS y 1.6 UI vitamina E/kg de PV

³LSeHE, 0.1 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

⁴HSeHE, 0.3 mg Se/kg de MS y 2.0 UI vitamina E/kg de PV

EEM, error estándar de la media

d, día

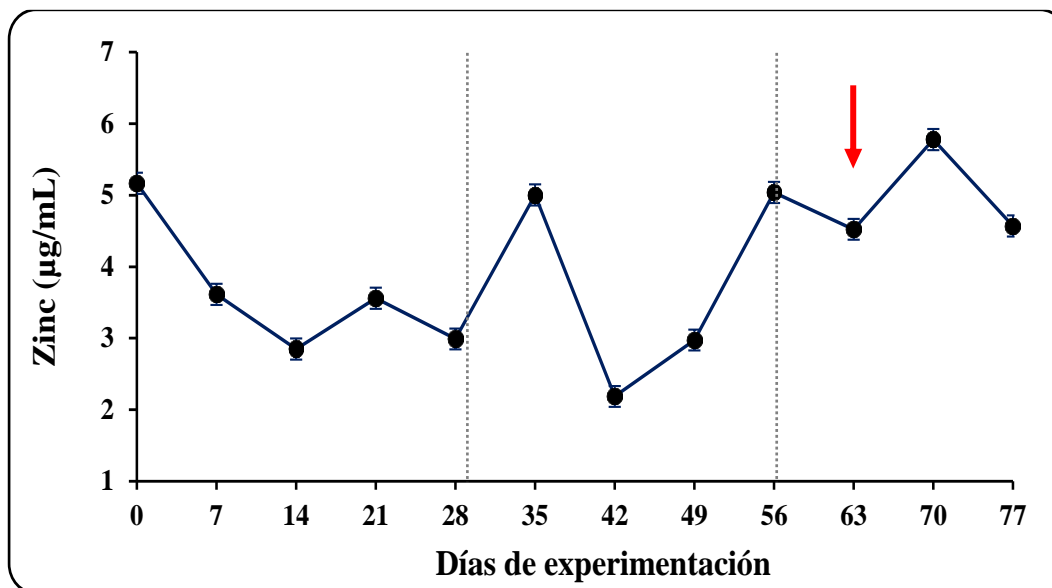


Figura 4.10 Concentraciones de zinc en sangre de caballos complementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

El comportamiento de las concentraciones de Zn se presenta en la figura 4.10. La concentración sanguínea basal de Zn fue de $5.17 \mu\text{g/mL}$ (0.15 EEM). Una semana después del inicio de la doble complementación con Se y E, las concentraciones de Zn sanguíneo descendieron y se mantuvieron sin cambios ($P > 0.05$) hasta d 28 ($3.25 \mu\text{g Zn/mL} \pm 0.095 \text{ EEM}$). Durante P2, el comportamiento del elemento en la sangre completa fue oscilante; en d 35 hubo un incremento ($P < 0.05$, $5.00 \mu\text{g Zn/mL} \pm 0.15 \text{ EEM}$); en d 42 se cuantificó la concentración más baja ($P < 0.05$, $2.19 \mu\text{g Zn/mL} \pm 0.15 \text{ EEM}$) de todo el periodo experimental. Después se incrementó de nuevo hasta alcanzar en d 56, $5.04 \mu\text{g Zn/mL} \pm 0.15 \text{ EEM}$, lo que no fue diferente ($P > 0.05$) de la concentración en d 0 y d 35. En d 53 hubo un nuevo descenso ($4.52 \mu\text{g Zn/mL} \pm 0.15 \text{ EEM}$) que no fue diferente de d 35. Al día 70, el Zn incrementó de nuevo, pero las concentraciones no difirieron de las basales ($P > 0.05$,

5.78 $\mu\text{g Zn/mL} \pm 0.15$ EEM). Al día 77, se observó otro descenso que no difirió ($P > 0.05$) de lo observado en d 63 (4.57 $\mu\text{g Zn/mL} \pm 0.15$ EEM).

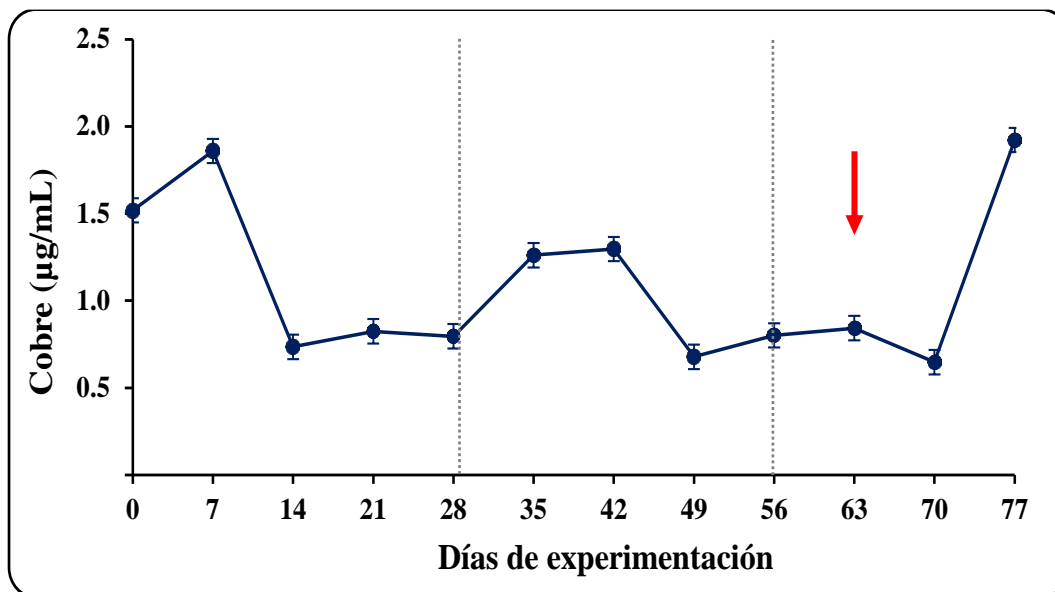


Figura 4.11 Concentraciones de cobre en sangre de caballos complementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de DL- α -tokoferol (1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado (días entre líneas punteadas). Días 0 a 28, periodo de adaptación sin ejercicio; días 29 a 56, periodo de trabajo moderado (3 días consecutivos de ejercicio por 4 días de descanso); días 57 a 63, periodo de recuperación; días 64 a 77, regreso paulatino a las condiciones pre-experimentales. La flecha señala el fin de la complementación. Las barras perpendiculares corresponden al error estándar de la media.

La figura 4.11 muestra el comportamiento del Cu en sangre a través del tiempo. La concentración basal del metal fue de 1.52 $\mu\text{g Cu/mL} \pm 0.07$ EEM; que incrementó en d 7 (1.86 $\mu\text{g Cu/mL} \pm 0.07$ EEM). La concentración disminuye 2.39 veces, no hay diferencia ($P > 0.05$) entre los días 14, 21 y 28 (0.78 $\mu\text{g Cu/mL} \pm 0.02$ EEM). En el día 35 hay un incremento que se sostiene hasta el d 42 ($P > 0.05$, 1.28 $\mu\text{g Cu/mL} \pm 0.05$ EEM). Del día 49 al 70, se aprecia otra disminución en la concentración sanguínea del Cu, que no fue diferente de la observada en d 14 a d 28 ($P > 0.05$, 0.74 $\mu\text{g Cu/mL} \pm 0.03$ EEM).

Finalmente, en d 77, las concentraciones presentan valores no diferentes ($P > 0.05$) de los observados en d 7 ($1.92 \mu\text{g Cu/mL} \pm 0.07 \text{ EEM}$).

El zinc y el cobre son metales que participan en el metabolismo de huesos y cartílagos; por ello, en algunos estudios de caballos se atiende a la relación Zn/Cu (Wichert *et al.*, 2002), sin embargo, estas no están totalmente establecidas, ya que no sólo dependen de sus aportes alimentarios, sino también de las interacciones con otros elementos como el hierro, manganeso, calcio y fósforo (Suttle, 2010). El Zn participa en más de 200 proteínas; en el músculo se almacena del 50 al 60 % del total de Zn corporal; mientras que el Cu participa en la síntesis de hemoglobina y en la conductividad nerviosa (Jackson, 1997). El papel como antioxidantes de ambos metales es participando con la enzima superóxido dismutasa citosólica.

Como ya se mencionó, ambos elementos fueron afectados por el ejercicio, en el caso del Cu, este incremento se observó en los días 35 y 42 que corresponden al inicio y la segunda semana de ejercicio para disminuir después. En lo referente a las concentraciones sanguíneas de Zn, el comportamiento fue variable durante el ejercicio, del día 35 al 42 hubo un descenso de 2.29 veces; sin embargo, en d 56 se recuperó la concentración observada en d 0 y d 35. La cuantificación de Cu y Zn se realiza frecuentemente en el plasma o suero y poco en la sangre completa. Massanyi *et al.* (2014) cuantificaron metales pesados, entre ellos Zn y Cu, en equinos sanos y reportaron que en las concentraciones de Zn en plasma son 13.08 % y las de Cu son 44.04 % menores que las de sangre completa, estos valores son los siguientes:

- ❖ Cu, $3.84 \pm 0.90 \mu\text{g/mL}$
- ❖ Zn, $26.67 \pm 14.12 \mu\text{g/mL}$

En otro trabajo (Smith *et al.*, 1975) realizado con ponies suplementados durante 90 días, con Cu (8, 262, 458, 791, $\mu\text{g de Cu/kg MS}$), las concentraciones sanguíneas del metal no

mostraron variaciones (0.77, 0.77, 0.67, 0.73, $\mu\text{g/mL} \pm 0.06$ EEM, respectivamente), a excepción del grupo suplementado con 458 $\mu\text{g Cu/kg MS}$ que presentó un descenso.

Mientras que las concentraciones del metal en plasma (0.96, 0.97, 0.92, 0.93, $\mu\text{g/mL} \pm 0.07$ EEM, respectivamente) mostraron el mismo comportamiento que la sangre. Las concentraciones de Cu sanguíneo reportadas en el trabajo de Smith *et al.* (1975) son más cercanas a los resultados del presente trabajo que los de Massanyi *et al.* (2014), aun cuando, estos últimos trabajaron con caballos no suplementados. En cuanto al Zn, sólo se cuenta con los valores consignados por Massanyi *et al.* (2014), cuya relación sangre/plasma de Zn es de 0.87 (13.08 % de diferencia); lo que implicaría una concentración plasmática de 10.91 a 35.46 $\mu\text{g Zn/mL}$. Sin embargo, los valores reportados para el plasma son considerablemente menores; Meyer (1995; citado por Wichert *et al.*, 2002) indicó como valores de referencia para el Zn en plasma de 0.6 a 1.2 $\mu\text{g/mL}$. De Moffarts *et al.* (2005) utilizaron una mezcla de antioxidantes (ac. ascórbico, 11.5; α -tocoferol, 7.0; β -caroteno, 0.5; Cu, 0.187; Zn, 0.769, g/día; Se, 7.0 mg/día) o un placebo en caballos pura sangre, detectando que no hubo diferencia ($P > 0.05$) entre grupos y el promedio de la concentración de Zn plasmático fue de 0.56 $\mu\text{g Zn/mL}$. En una exploración de 493 perfiles sanguíneos de equinos, Kirschvink *et al.* (2006) observaron en el plasma concentraciones de Zn de 0.46 a 0.54 $\mu\text{g/mL}$, y de Cu estuvieron entre 0.82 a 1.06 $\mu\text{g/mL}$, las cuales no fueran afectadas por la raza, ni por la disciplina, ni el género, ni la edad.

Como ya se mencionó, las concentraciones sanguíneas de Zn y Cu fueron afectadas por el tiempo, observándose los cambios en P2. Yur *et al.* (2008) reportaron en caballos de Anatolia, que realizaron ejercicio 1.5 h después de la aplicación intramuscular de 8.0 mg de vitamina E y 480.0 mg de Se y a otros no, un incremento en las concentraciones plasmáticas de Cu en el grupo control (de 0.74 a 1.91 $\mu\text{g/mL}$), después de la realización de ejercicio. En cuanto al Zn, observaron mayor concentración plasmática del elemento en el grupo control (0.06 vs 0.5 $\mu\text{g de Zn/mL}$), pero no hubo efecto del ejercicio ($P > 0.05$); el cual es inconsistente sobre las concentraciones sanguíneas o plasmáticas en

los minerales traza; mientras algunos autores han observado incrementos (Inoue *et al.*, 2002; Yur *et al.*, 2008), otros mencionan que, por ejemplo en el humano, la respuesta es variable de acuerdo con el individuo (Aruoma *et al.*, 1988), otros más no demostraron el efecto del ejercicio en caballos (Wagner *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2011). Ohno *et al.* (1985; citados por Inoue *et al.*, 2002) mencionan el flujo de Zn eritrocitario hacia el plasma. En el presente estudio se observó en d 35, un incremento de Zn y Cu, y una pérdida en el PV de los animales, atribuida a la sudoración. Inoue *et al.* (2002) atribuyeron el incremento de Zn y Cu séricos en caballos pura sangre, sometidos a un ejercicio estándar a la hemoconcentración. La correlación observada en d 35 entre el PV y la concentración sanguínea de Cu ($P = 0.011$; $r = 0.51$) apoya lo mencionado por Inoue *et al.* (2002). Sin embargo para el Zn, no se observó esta asociación. Por otra parte, los contenidos de Zn (10.3 mg/L) y Cu (4.0 mg/L) en el sudor del caballo (Meyer, 1987) implican pérdidas importantes dependiendo de la cantidad de sudor producido.

El cuadro 4.15 muestra las relaciones entre la actividad de la SOD, MDA y el COR y las concentraciones sanguíneas de Zn y Cu. Sin embargo, se establecieron principalmente en situaciones de actividad física.

La SOD citoplásmica contiene Cu y Zn, un átomo de cada uno en cada monómero (Fridovich, 1976), lo que ayuda a explicar la relación directa de la SOD eritrocitaria con el Cu e inversa con el Zn, observada el d 21. Abdallah y Samman (1993) observaron en humanos, complementados con sulfato de Zn (50 mg Zn/día), una disminución ($P < 0.02$) en la actividad eritrocitaria de la SOD. También reportaron la asociación entre la actividad eritrocitaria de SOD y el contenido eritrocitario de Zn, que podría (ya que no fue significativa), indicar que a mayor contenido eritrocitario de Zn, menor actividad de la SOD.

$$\text{SOD (U/g Hb}^8) = 2776 - 18.7 \times \text{Zn } (\mu\text{g/g Hb})$$

⁸ Hb, hemoglobina

El decremento de la actividad de la SOD no estuvo acompañado de cambios en el contenido eritrocitario de Zn (Abdallah y Samman, 1993). En el presente estudio, la asociación negativa entre SOD y Zn observada en d 21, puede atribuirse al antagonismo Cu y Zn, reportado tanto en la absorción digestiva (Suttle, 2010), como en las articulaciones (Roczniak *et al.*, 2017). La presentación de esta asociación en 21d, es consistente con el hecho de que la actividad de la GPx refleja la complementación con Se, 21 días después de su inicio. Sin embargo, la ausencia de correlaciones, no permite aceptar esta hipótesis.

Cuadro 4.15 Asociaciones entre variables sanguíneas de caballos complementados con dos niveles de selenio (seleno-levadura, 0.1 y 0.3 mg Se/kg de MS) y dos niveles de vitamina E (DL- α -tocoferol, 1.6 y 2.0 UI/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Ecuación	Valor de P	s	r ² ajustado
Día 21			
SOD (U/mL) = 47.4 + 52.9 × Cu (µg/mL) - 10.5 × Zn (µg/mL)	0.026	12.58	22.66
Día 28			
Cu (µg/mL) = 0.131 + 0.2224 × Zn (µg/mL)	<0.001	0.17	46.53
Día 35			
COR = 1023 - 146.5 × Zn (µg/mL)	0.020	183.28	18.59

Una semana después, las concentraciones de Cu y Zn estuvieron directamente asociadas ($P > 0.001$, $r^2 = 46.53$), lo que contradice el antagonismo de ambos metales ya mencionado. Sin embargo, cabe señalar que la cuantificación del elemento se realizó en sangre total, por lo que esta relación puede atribuirse a las variaciones de los elementos en plasma y no a los eritrocitos, ya que las concentraciones sanguíneas de los metales no se asociaron ($P > 0.05$) con la actividad de la SOD al día 28.

Las concentraciones plasmáticas de cortisol estuvieron inversamente asociadas ($P < 0.02$) a las concentraciones sanguíneas de Zn. Diferentes autores han observado la conexión entre el Zn con el metabolismo de los corticosteroides de la adrenal, además tanto el estrés fisiológico como psicológico son capaces de incrementar el cortisol sérico en 7 días y de disminuir el Zn sérico en 14 días (Soria *et al.*, 2015). El incremento en la concentración de corticosterona en respuesta a la deficiencia de Zn puede atribuirse al incremento en la actividad del eje HPA (Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal), ya que en el hipocampo existen neuronas zincérgicas, cuya función se ha relacionado con el estrés oxidativo, Se y manganeso (Soria *et al.*, 2015).

4.7 DISCUSIÓN GENERAL

El caballo es el animal doméstico más veloz, sus potentes sistemas cardiorespiratorio y osteomuscular son el resultado de millones de años de evolución. El ser humano ha desarrollado razas de caballos para diferentes actividades físicas, generando mayores presiones en la fisiología y metabolismo del individuo para que sus actividades incluyan fuerza, velocidad y belleza de movimientos. En el presente trabajo, caballos policías con un mes de descanso previo al desarrollo del trabajo experimental fueron sometidos a un esquema de ejercicio moderado, lo que causó una serie de cambios en el individuo (hipertermia, deshidratación por respiración y principalmente por sudoración con la consecuente pérdida de peso y de elementos asociados a la sudoración como el Zn y el Cu, además de sodio, cloro y potasio). La hipertermia es un factor que provoca deshidratación y lipoperoxidación; en esta relación de causa-efecto, se menciona que la deshidratación afecta la susceptibilidad de la célula al daño oxidativo y a la apoptosis (Schlösser y Haussinger, 2002). La asociación entre deshidratación y estrés oxidativo se ha estudiado muy poco en humanos (Hillman et al., 2011) por lo que requiere investigación en las otras especies.

En humanos, la realización de ejercicio moderado ha demostrado que estimula los mecanismos antioxidantes de forma importante. En las unidades experimentales, el ejercicio aunque moderado elevó las concentraciones séricas de cortisol y de malondialdeído; el primero corresponde a la hormona de respuesta ante demandas energéticas, pero a largo plazo sus elevadas concentraciones como fueron las cuantificadas en este trabajo son responsable del estrés patológico; el segundo analito es un indicador de peroxidación lipídica que se generó ante esta situación de actividad física. Si bien, en la actualidad, existen otros indicadores de peroxidación lipídica al parecer más acertados como lo son los isoprostanos, el malondialdeído ha sido el indicador mayormente utilizado, sin embargo no se conocen valores considerados como “fisiológicos”.

El ejercicio físico incrementó también la actividad de las enzimas asociadas al daño muscular (CK, AST y LDH) y de las intraeritrocitarias de efecto antioxidante (SOD y GPx). Los aumentos de la actividad de las enzimas asociadas al daño muscular no alcanzaron niveles para considerar un daño al sarcolema, lo que no fue un objetivo de este trabajo. En cuanto a la actividad de la GPx eritrocitaria, misma que constituye la principal enzima antioxidante del eritrocito, fue afectada por los niveles de suplementación con selenio y DL- α -tocoferol, mostrando la sinergia funcional entre los dos nutrimentos en la realización de la actividad física más demandante que de acuerdo con los diferentes resultados fue el día 42. Las unidades experimentales de este estudio mostraron que las pendientes negativas correspondientes al descenso de las concentraciones sanguíneas de Se al término del ejercicio, tanto para la dosis baja (0.1 mg de Se/kg MS), como la alta (0.3 mg de Se/kg MS) estuvieron próximas. Por lo que en animales con deficiencia subclínica del elemento, una mayor dosis no implica que se constituyan reservas importantes del elemento que representen un descenso menos rápido de la actividad de la GPx. Este resultado es contradictorio a lo observado en animales no deficientes en Se.

Las concentraciones sanguíneas de los minerales traza, se vieron también afectadas por la actividad física y en el caso del Zn, se asociaron a las concentraciones de otros metabolitos como el cortisol. La actividad metabólica de los minerales traza, no está completamente dilucidada y por las características de la investigación en equinos, la información es aun menos abundante respecto a las otras especies de animales domésticos.

En general la suplementación con selenio y vitamina E no mejoró los indicadores asociados al desempeño físico del animal, el cual representa ajustes metabólicos importantes para que el caballo pueda desarrollar la actividad física demandada. Sin embargo, la ausencia de respuesta con base en las cantidades proporcionadas de selenio, sugieren que la dosis pudo no llenar las necesidades de los animales. Por otra parte, las recomendaciones alimentarias existentes para vitamina E, deben orientarse a precisar que

la única fuente que llena las necesidades de los caballos es el D- α -tocoferol. Lo anterior, así como las interacciones estadísticas y fisiológicas observadas, lleva a sugerir que las recomendaciones alimentarias deben revisarse bajo diferentes condiciones experimentales.

5 CONCLUSIONES

Esta investigación se diseñó para estudiar el efecto de la complementación con dos niveles de Se y dos niveles de vitamina E, en las concentraciones séricas de cortisol, malondialdehído (MDA), la actividad de enzimas relacionadas con la actividad o daño muscular (creatina quinasa, CK; aspartato aminotransferasa, AST; lactato deshidrogenasa, LDH) y en las de acción antioxidante enzimática (superóxido dismutasa, SOD; glutatión peroxidasa, GPx) en equinos sometidos a ejercicio moderado; así como, en las concentraciones séricas de vitamina E y sanguíneas de Se, Zn y Cu. Bajo las condiciones experimentales se concluye lo siguiente:

a) El ejercicio físico aunque moderado, implica una serie de cambios fisiológicos para que el organismo del caballo responda a un incremento en la necesidad de energía, y para contrarrestar los efectos de la generación de oxidantes, lo anterior reflejado por el incremento en la actividad de la GPx en la etapa de ejercicio físico, el cual afecta además, las concentraciones séricas de minerales traza y modifica la actividad sérica de las enzimas asociadas al daño muscular. En humanos se ha considerado que la práctica de ejercicio moderado funciona como antioxidante; sin embargo, en caballos se requiere mayor investigación al respecto ya que los resultados observados en las concentraciones séricas de COR y de MDA indican cierto nivel de estrés fisiológico y daño oxidativo a los lípidos; además, de la alteración del sarcolema indicado por el aumento en las enzimas asociadas al daño muscular (CK, AST y LDH).

b) Contrariamente a la hipótesis planteada, las concentraciones séricas de cortisol son afectadas por el nivel de suplementación con Se; los caballos que recibieron 0.3 mg Se/kg MS tuvieron mayores concentraciones de la hormona respecto a los que recibieron 0.1 mg Se/kg MS. Se requiere mayor investigación al respecto, teniendo en cuenta un mayor número de indicadores bioquímicos que permitan dilucidar si el incremento de cortisol optimiza la utilización de la energía o es detrimental, considerando el nivel de estrés que presentan los caballos policía.

c) El nivel de complementación con selenio y vitamina E, no afecta las concentraciones de malondialdehído (MDA), el indicador más frecuentemente utilizado para la peroxidación lipídica. Sin embargo, ajustes en la dieta pueden generar elevaciones importantes en las concentraciones séricas de MDA, incluso con mayor efecto que el ejercicio moderado. Lo que implicaría ajustar durante los periodos de actividad física, el aporte de antioxidantes dietarios para minimizar el efecto de la oxidación lipídica y posiblemente de las otras biomoléculas. Por lo que se requiere continuar con la realización de investigaciones en este punto.

d) El nivel de complementación con selenio afecta de forma global, tanto las concentraciones sanguíneas de selenio como las concentraciones séricas de α -tocoferol. En caballos con deficiencia subclínica de selenio sometidos a un ejercicio físico moderado, los niveles sanguíneos de Se se recuperan a los 21 días, sin embargo la demanda metabólica ocasionada por la realización de actividad física moderada ocasiona que las concentraciones disminuyan de forma importante. Por otra parte, la complementación con DL- α -tocoferol no permite que el caballo con deficiencia subclínica eleve su contenido sérico de α -tocoferol. Se requiere mayor investigación a propósito de las fuentes, cantidades e interacción selenio y vitamina E, para precisar las recomendaciones alimentarias y las fuentes más disponibles para los caballos.

e) La actividad de las enzimas asociadas a daño muscular CK, AST y LDH se incrementa principalmente por la actividad física y no responde a los niveles de suplementación con selenio y vitamina E; sin embargo, al parecer responden a los ajustes alimentarios por lo que podrían utilizarse como indicadores de la pérdida de masa muscular ante los cambios alimentarios. Sin embargo, se requiere mayor investigación al respecto.

- f) La actividad de la SOD eritrocitaria es afectada por el ejercicio físico, pero no por los niveles de complementación con Se y vitamina E.
- g) La actividad de la enzima eritrocitaria GPx es afectada por la complementación con selenio y vitamina E, asociada a la realización de la actividad física. El efecto de la interacción metabólica del Se y la vitamina E puede observarse bajo condiciones de mayor demanda metabólica para la realización de actividad física.

Las concentraciones sanguíneas de zinc y cobre varían en función de la actividad física; el primero se relaciona con las concentraciones séricas de cortisol, la actividad de la SOD y las concentraciones sanguíneas de cobre. Evidenciando la interacción de los minerales traza en los periodos de actividad física.

6 IMPLICACIONES

Los resultados de este estudio muestran como el ejercicio moderado en caballos, aunque sea de intensidad moderada genera cambios metabólicos importantes y también peroxidación lipídica. El Se y la vitamina E tienen un papel molecular sincronizado, y si bien diferentes trabajos han evidenciado los efectos beneficiosos de elevadas dosis de vitamina E, éstas deben ser manejadas por periodos limitados de tiempo ya que pueden generarse desequilibrios entre la vitamina y el Se. La literatura existente apoya a la necesidad de revisar las recomendaciones alimentarias de vitamina E y Se, teniendo en cuenta las interacciones con los otros nutrimentos. Por otra parte, deben realizarse mayores estudios con el DL- α -tocoferol, el cual parece no ser adecuado como fuente dietaria de vitamina E por lo que debiera descartarse como fuente sugerida. En el mercado existen otras fuentes sin embargo su costo limita su uso.

7 REFERENCIAS

- Abarikwu, S. O., Iserhienrhien, B. O., Badejo, T. A. (2013). Rutin-and selenium-attenuated cadmium-induced testicular pathophysiology in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 32(4), 395-406.
- Abdallah, S. M., Samman, S. (1993). The effect of increasing dietary zinc on the activity of superoxide dismutase and zinc concentration in erythrocytes of healthy female subjects. *European journal of clinical nutrition*, 47, 327-327.
- Abdel-Khalek, A. M., Selim, N. A., El-Medany, S. A., Nada, S. A. (2008). Response of doe rabbits to dietary antioxidant vitamins E and C during pregnancy and lactation. In *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, Italy* (pp. 519-523).
- Abumrad, N. A., Davidson, N. O. (2012). Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiological Reviews*, 92(3), 1061-1085.
- Acosta García, E., Carías, D., Páez Valery, M., Naddaf, G., Domínguez, Z. (2017). Zinc, cobre y vitaminas C, E y A en púberes con exceso de peso y resistencia a la insulina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 51(2), 203-212.
- Adamu, L., Adzahan, N. M., Abdullah, R., Ahmad, B. (2010). Effects of race distance on physical, hematological and biochemical parameters of endurance horses. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 5(4), 244-248.
- Adeyemi, O. T., Osilesi, O., Adebawo, O. O., Onajobi, F. D., Oyedemi, S. O., Afolayan, A. J. (2015). Alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities in selected tissues of rats fed on processed atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(03), 139.
- Aitken, R., Clarkson, J. S. (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9(6), 367-376.
- Akil, M., Gurbuz, U., Bicer, M., Sivrikaya, A., Mogulkoc, R., Baltaci, A. K. (2011). Effect of selenium supplementation on lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and lactate levels in rats immediately after acute swimming exercise. *Biological Trace Element Research*, 142(3), 651-659.
- Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, D. A., Markesbery, W. R. (2000). Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 74(6), 2520-2527.
- Al.Marlin, D. J., Fenn, K., Smith, N., Deaton, C. D., Roberts, C. A., Harris, P. A., ... Kelly, F. J. (2002). Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *The Journal of Nutrition*, 132(6), 1622S-1627S.

- Al-Qudah, K. M., Al-Majali, A. M. (2006). Status of biochemical and antioxidant variables in horses before and after long distance race. *Revue De Médecine Vétérinaire*, 157(6), 307-310.
- Andriichuk, A., Tkachenko, H., Kurhaluk, N. (2014). Gender differences of oxidative stress biomarkers and erythrocyte damage in well-trained horses during exercise. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(8), 978-985.
- Andriichuk, A., Tkachenko, H., Tkachova, I. (2016). Oxidative stress biomarkers and erythrocytes hemolysis in well-trained equine athletes before and after exercise. *Journal of Equine Veterinary Science*, 36, 32-43.
- Andrzejewski, M., Chmura, J. (2008). The influence of individualizing physical loads on speed, creatine kinase activity and lactate dehydrogenase in football players. *Biology of Sport*, 25(2), 177-186
- AOAC, Official methods of analysis of AOAC International 17th ed., Eds. W. Horwitz, W. Horwitz, AOAC International, Gaithersburg, MD, 2000.
- Art, T., Lekeux, P. (1993). Training-induced modifications in cardiorespiratory and ventilatory measurements in Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 25(6), 532-536.
- Art, T., Lekeux, P. (2005). Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. *Livestock Science*, 92(2), 101-111.
- Arthur, J. R., McKenzie, R. C., Beckett, G. J. (2003). Selenium in the immune system. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1457S-1459S.
- Artioli, G. G., Gualano, B., Smith, A., Stout, J., Lancha Jr, A. H. (2010). Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. *Medicine and Science in Sports Exercise*, 42(6), 1162-1173.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., Butler, J. (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochemical Journal*, 256(1), 251.
- Askew, E. W. (2002). Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology*, 180(2), 107-119.
- Avellini, L., Chiaradia, E., Gaiti, A. (1999). Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 123(2), 147-154.
- Ayala, I., Martos, N. F., Silvan, G., Gutierrez-Panizo, C., Clavel, J. G., Illera, J. C. (2012). Cortisol, adrenocorticotropic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 103-107.
- Azzi, A. (2017). Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular aspects of medicine*.

- Azzi, A., Meydani, S. N., Meydani, M., Zingg, J. M. (2016). The rise, the fall and the renaissance of vitamin E. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 100-108.
- Bahorun, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V., Aruoma, O. I. (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*, 1(2), 25-41.
- Bailey, D. M., Young, I. S., McEneny, J., Lawrenson, L., Kim, J., Barden, J., Richardson, R. S. (2004). Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(4), H1689-H1699.
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 257-267.
- Barbosa, K. B., Bressan, J., Zulet, M. A., Martínez, J. H. (2008). Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 31, No. 3, pp. 259-280).
- Barton, M. H., Williamson, L., Jacks, S., Norton, N. (2003). Effects on plasma endotoxin and eicosanoid concentrations and serum cytokine activities in horses competing in a 48-, 83-, or 159-km endurance ride under similar terrain and weather conditions. *American Journal of Veterinary Research*, 64(6), 754-761.
- Bashandy, S. A. E. M., Omara, E. A. A., Ebaid, H., Amin, M. M., Soliman, M. S. (2016). Role of zinc as an antioxidant and anti-inflammatory to relieve cadmium oxidative stress induced testicular damage in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(12), 1056-1064.
- Bast, A., Haenen, G. R. (2003). Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors*, 17(1-4), 207-213.
- Bauernfeind, J. (1980). Tocopherols in foods. *Vitamin E: A comprehensive treatise*, 1, 99-145.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(4), 621-628.
- Baumber, J., Ball, B., Gravance, C., Medina, V., Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, 21(6), 895-902.
- Beech, J., Boston, R., Lindborg, S. (2011). Comparison of cortisol and ACTH responses after administration of thyrotropin releasing hormone in normal horses and those with pituitary pars intermedia dysfunction. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1431-1438.

- Bekheet, S. H. (2011). Comparative effects of repeated administration of cadmium chloride during pregnancy and lactation and selenium protection against cadmium toxicity on some organs in immature rats' offsprings. *Biological Trace Element Research*, 144(1-3), 1008-1023.
- Belviranlı, M., Gökbel, H. (2006). Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *European Journal of General Medicine*, 3(3), 126-131.
- Bendich, A. (2001). Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids institute of medicine washington, DC: National Academy Press, 2000 ISBN: 0-309-06935-1. *Nutrition*, 17(4), 364.
- Bergero, D., Miraglia, N., Schiavone, A., Polidori, M., Prola, L. (2004). Effect of dietary polyunsaturated fatty acids and vitamin E on serum oxidative status in horses performing very light exercise. *Italian Journal of Animal Science*, 3(2), 141-145.
- Bernard, W. (2013). Muscle disorders and performance problems. *En Equine Medicine Surgery and Reproduction* (pág. 451). E-Book.
- Bieri, J. (1972). Kinetics of tissue α -tocopherol depletion and repletion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 203(1), 181-191.
- Bierl, C., Voetsch, B., Jin, R. C., Handy, D. E., Loscalzo, J. (2004). Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26839-26845.
- Blackmore, D. J., Campbell, C., Dant, C., Holden, J. E., Kent, J. E. (1982). Selenium status of Thoroughbreds in the United Kingdom. *Equine Veterinary Journal*, 14(2), 139-143.
- Blakley, B. R., Bell, R. J. (1994). The vitamin A and vitamin E status of horses raised in Alberta and Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal*, 35(5), 297.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H. (2004). Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 29(3), 245-263.
- Boffi, F. M., Cittar, J., Balskus, G., Muriel, M., Desmaras, E. (2002). Training-induced apoptosis in skeletal muscle. *Equine Veterinary Journal*, 34(S34), 275-278.
- Bolfă, P. F., Leroux, C., Pintea, A., Andrei, S., Cătoi, C., Taulescu, M., ... Spînu, M. (2012). Oxidant-antioxidant imbalance in horses infected with equine infectious anaemia virus. *The Veterinary Journal*, 192(3), 449-454.
- Bondo, T., Jensen, S. K. (2011). Administration of RRR- α -tocopherol to pregnant mares stimulates maternal IgG and IgM production in colostrum and enhances vitamin E and IgM status in foals. *Journal Of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(2), 214-222.
- Bowler, R. P., Barnes, P. J., Crapo, J. D. (2004). The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1(2), 255-277.

- Brady, P. S., Ku, P. K., Ullrey, D. E. (1978). Lack of Effect of Selenium Supplementation on the Response of the Equine Erythrocyte Glutathione System and Plasma Enzymes to Exercise. *Journal of Animal Science*, 47(2), 492-496.
- Brancaccio, P., Maffulli, N., Limongelli, F. M. (2007). Creatine kinase monitoring in sport medicine. *British Medical Bulletin*, 81(1), 209-230.
- Brinkman, M., Buntinx, F., Muls, E., Zeegers, M. P. (2006). Use of selenium in chemoprevention of bladder cancer. *The Lancet Oncology*, 7(9), 766-774.
- Brooks, G. A. "Lactate shuttles in nature." (2002): 258-264. *Biochemical Society Transactions*, 30(part 2).
- Brooks, G. A., Dubouchaud, H., Brown, M., Sicurello, J. P., Butz, C. E. (1999). Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(3), 1129-1134.
- Brown, J. C., Valberg, S. J., Hogg, M., Finno, C. J. (2017). Effect of feeding two RRR-alpha-tocopherol formulations on serum, cerebrospinal fluid and muscle alpha-tocopherol concentrations in horses with subclinical vitamin E deficiency. *Equine Veterinary Journal*, 49: 753-758.
- Bruunsgaard, H., Galbo, H., Halkjaer-Kristensen, J., Johansen, T. L., MacLean, D. A., Pedersen, B. K. (1997). Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *The Journal of Physiology*, 499(3), 833-841.
- Bruynsteen, L., Janssens, G. P., Harris, P. A., Duchateau, L., Valle, E., Odetti, P., ... Hesta, M. (2014). Changes in oxidative stress in response to different levels of energy restriction in obese ponies. *British Journal of Nutrition*, 112(8), 1402-1411.
- Cairns, S. P. (2006). Lactic acid and exercise performance. *Sports Medicine*, 36(4), 279-291.
- Calamari, L. U. I. G. I., Abeni, F., Bertin, G. (2010). Metabolic and hematological profiles in mature horses supplemented with different selenium sources and doses 1 2. *Journal of Animal Science*, 88(2), 650-659.
- Calamari, L., Ferrari, A., Bertin, G. (2009a). Effect of selenium source and dose on selenium status of mature horses. *Journal of Animal Science*, 87(1), 167-178.
- Calamari, L., Piccioli Cappelli, F., Caré, S., Bertin, G. (2009b). Effect of Se source and dose on selenomethionine and selenocysteine levels in blood and plasma of mature horses. *Italian Journal of Animal Science*, 8(sup2), 694-696.
- Caple, I. W., Edwards, S. J. A., Forsyth, W. M., Whiteley, P., Selth, R. H., Fulton, L. J. (1978). Blood glutathione peroxidase activity in horses in relation to muscular dystrophy and selenium nutrition. *Australian Veterinary Journal*, 54(2), 57-60.

- Carmel, D. K., Crisman, M. V., Ley, W. B., Irby, M. H., Edwards, G. H. (1990). A survey of whole blood selenium concentrations of horses in Maryland. *The Cornell Veterinarian*, 80(3), 251-258.
- Carter, E. I., Valli, V. E., McSherry, B. J., Lumsden, J. H., Milne, F. J., Robinson, G. A. (1974). The kinetics of hematopoiesis in the light horse I. The lifespan of peripheral blood cells in the normal horse. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 38(3), 303-313.
- Castellini, C., Mourvaki, E., Dal Bosco, A., Galli, F. (2007). Vitamin E biochemistry and function: a case study in male rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(3), 248-256.
- Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(9), 1482-1495.
- Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 157(1), 1-11.
- Chakraborty, S., Singh, O. P., Dasgupta, A., Mandal, N., Das, H. N. (2009). Correlation between lipid peroxidation-induced TBARS level and disease severity in obsessive-compulsive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(2), 363-366.
- Chang, Y. T., Chang, W. N., Tsai, N. W., Huang, C. C., Kung, C. T., Su, Y. J., ... Lu, C. H. (2014). The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. *BioMed Research International*, 2014.
- Chattopadhyay, S., Pal, S., Ghosh, D., Debnath, J. (2003). Effect of dietary co-administration of sodium selenite on sodium arsenite-induced ovarian and uterine disorders in mature albino rats. *Toxicological Sciences*, 75(2), 412-422.
- Chen, Y. I., Wei, P. C., Hsu, J. L., Su, F. Y., Lee, W. H. (2016). NPGPx (GPx7): a novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. *American Journal of Translational Research*, 8(4), 1626-1640.
- Chiaradia, E., Avellini, L., Rueca, F., Spaterna, A., Porciello, F., Antonioni, M. T., Gaiti, A. (1998). Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 119(4), 833-836.
- Chung, J. Y., Kim, J. H., Ko, Y. H., Jang, I. S. (2007). Effects of dietary supplemented inorganic and organic selenium on antioxidant defense systems in the intestine, serum, liver and muscle of Korean native goats. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(1), 52.
- Combs Jr, G. F., Combs, S. B. (1986). *The role of selenium in nutrition*. Academic Press, Inc..

- Combs Jr, G. F., Scott, M. L. (1977). Nutritional interrelationships of vitamin E and selenium. *Bioscience*, 27(7), 467-473.
- Cordero, M., Brorsen, B. W., McFarlane, D. (2012). Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and α -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 43(4), 317-324.
- Costantini, D., Verhulst, S. (2009). Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress?. *Functional Ecology*, 23(3), 506-509.
- Cruz, K. J. C., de Oliveira, A. R. S., do Nascimento Marreiro, D. (2015). Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(2), 333-337.
- Cuellar, F. A., Ariza, E., Anzola, C., Restrepo, P. (2013). Estudio de la capacidad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) durante la maduración. *Revista Colombiana de Química*, 42(2), 21-28.
- Cuff, T. L., Williams, R. J., Deaton, C. M., Smith, N. C., Davies, B. D., Davies-Morel, M. C. G., ... Harris, P. A. (2005). Changes in plasma cortisol and ascorbic acid in horses with and without recurrent airway obstruction upon exercise and ascorbic acid supplementation. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 2(2), 105-112.
- Dai, J., Jones, D. P., Goldberg, J., Ziegler, T. R., Bostick, R. M., Wilson, P. W., Manatunga, A. k., Shallenberger, L., Vaccarino, V. (2008). Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress—. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(5), 1364-1370.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52(4), 601-623.
- De Graaf-Roelfsema, E., Back, W., Keizer, H. A., Stout, T. A. E., Van Der Kolk, J. H. (2009). Normal function of the hypothalamic-pituitary growth axis in three dwarf Friesian foals. *The Veterinary Record*, 165(13), 373.
- De Graaf-Roelfsema, E., Keizer, H. A., Wijnberg, I. D., Van Der Kolk, J. H. (2010). The incidence and severity of gastric ulceration does not increase in overtrained Standardbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 58-61.
- De Graaf-Roelfsema, E., Veldhuis, P. P., Keizer, H. A., van Ginneken, M. M., van Dam, K. G., Johnson, M. L., ... van der Kolk, J. H. (2009). Overtrained horses alter their resting pulsatile growth hormone secretion. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(2), R403-R411.
- De Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J., Lekeux, P. (2005). Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *The Veterinary Journal*, 169(1), 65-74.

- De Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J., Lekeux, P. (2005). Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *The Veterinary Journal*, 169(1), 65-74.
- De Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J., Michaux, C., Cayeux, K., ... Lekeux, P. (2004). Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 1(3), 211-220.
- Deagen, J. T., Butler, J. A., Beilstein, M. A., Whanger, P. D. (1987). Effects of dietary selenite, selenocystine and selenomethionine on selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues. *The Journal of Nutrition*, 117(1), 91-98.
- Deaton, C. M., Marlin, D. J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2(3), 278-291.
- Deaton, C. M., Marlin, D. J., Roberts, C. A., Smith, N., Harris, P. A., Kelly, F. J., Schroter, R. C. (2002). Antioxidant supplementation and pulmonary function at rest and exercise. *Equine Veterinary Journal*, 34(S34), 58-65.
- Deaton, C. M., Marlin, D. J., Smith, N. C., Harris, P. A. (2004). Antioxidant supplementation in horses affected by recurrent airway obstruction1, 2. *The Journal of Nutrition*, 134(8S), 2065S-2067S.
- Deaton, C. M., Marlin, D. J., Smith, N. C., Roberts, C. A., Harris, P. A., Schroter, R. C., Kelly, F. J. (2005). Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine Veterinary Journal*, 37(3), 243-249.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316-328.
- DellaPenna, D. (2005). A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *Journal of Plant Physiology*, 162(7), 729-737.
- DellaPenna, D., Mène-Saffrané, L. (2011). Vitamin E. *Advances in Botanical Research*, 59, 179-227. DOI: [10.1016/B978-0-12-385853-5.00002-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385853-5.00002-7)
- Derave, W., Ozdemir, M. S., Harris, R. C., Pottier, A., Reyngoudt, H., Koppo, K., ... Achten, E. (2007). β -Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *Journal of Applied Physiology*, 103(5), 1736-1743.
- Desai, I. D., Scott, M. L. (1965). Mode of action of selenium in relation to biological activity of tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 110(2), 309-315.
- Divers, T. J., Cummings, J. E., de Lahunta, A., Hintz, H. F., Mohammed, H. O. (2006). Evaluation of the risk of motor neuron disease in horses fed a diet low in vitamin

- E and high in copper and iron. *American Journal of Veterinary Research*, 67(1), 120-126.
- Doyen, P., Vasseur, P., Rodius, F. (2006). Identification, sequencing and expression of selenium-dependent glutathione peroxidase transcript in the freshwater bivalve *Unio tumidus* exposed to Aroclor 1254. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143(1), 1-7.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- DSM-OVM, Vitamin supplementation guidelines. [Internet] 2016 (Citado el 18 de noviembre 2017] disponible en (https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/Vitamin_Supp_Guidelines.pdf?download=73e85c11-0009-44cc-93ee-a1c08dd287711512671265733).
- Duberstein, K. J., Johnson, S. E., McDowell, L. R., Ott, E. A. (2009). Effects of vitamin E supplementation and training on oxidative stress parameters measured in exercising horses. *Comparative Exercise Physiology*, 6(1), 17-25.
- Ducharme, N. G., Fortier, L. A., Kraus, M. S., Hobo, S., Mohammed, H. O., McHugh, M. P., ... Mitchell, L. M. (2009). Effect of a tart cherry juice blend on exercise-induced muscle damage in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 70(6), 758-763.
- Duncker, D. J., Bache, R. J. (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological Reviews*, 88(3), 1009-1086.
- Durackova, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 59(4), 459-469.
- Durando, M. M., Reef, V. B., Kline, K., Birks, E. K. (2006). Acute effects of short duration, maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 3(4), 217-223.
- Edge, J., Bishop, D., Goodman, C. (2006). The effects of training intensity on muscle buffer capacity in females. *European Journal of Applied Physiology*, 96(1), 97-105.
- El-Ashker, M. R. (2011). Acute kidney injury mediated by oxidative stress in Egyptian horses with exertional rhabdomyolysis. *Veterinary Research Communications*, 35(5), 311-320.
- El-Deeb, W. M., El-Bahr, S. M. (2010). Investigation of selected biochemical indicators of Equine Rhabdomyolysis in Arabian horses: pro-inflammatory cytokines and oxidative stress markers. *Veterinary Research Communications*, 34(8), 677-689.
- Ememe, M. U., Mshelia, W. P., Ayo, J. O. (2015). Ameliorative effects of resveratrol on oxidative stress biomarkers in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(6), 518-523.

- Erdelyi, I., Levenkova, N., Lin, E. Y., Pinto, J. T., Lipkin, M., Quimby, F. W., Holt, P. R. (2009). Western-style diets induce oxidative stress and dysregulate immune responses in the colon in a mouse model of sporadic colon cancer. *The Journal of Nutrition*, 139(11), 2072-2078.
- Eto, D., Yamano, S., Mukai, K., Sugiura, T., Nasu, T., Tokuriki, M., Miyata, H. (2004). Effect of high intensity training on anaerobic capacity of middle gluteal muscle in Thoroughbred horses. *Research in Veterinary Science*, 76(2), 139-144.
- Fairweather-Tait, S. J., Collings, R., Hurst, R. (2010). Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements-. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1484S-1491S.
- Faude, O., Kindermann, W., Meyer, T. (2009). Lactate threshold concepts. *Sports Medicine*, 39(6), 469-490.
- Fejsáková, M., Kottferová, J., Dankulincová, Z., Haladová, E., Matos, R., Miño, I. (2014). Some possible factors affecting horse welfare assessment. *Acta Veterinaria Brunensis*, 82(4), 447-451.
- Ferraz, G. C., D Angelis, F. H. F., Teixeira-Neto, A. R., Freitas, E. V. V., Lacerda-Neto, J. C., Queiroz-Neto, A. (2008). Blood lactate threshold reflects glucose responses in horses submitted to incremental exercise test. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(1), 256-259.
- Fielding, C. L., Magdesian, K. G., Rhodes, D. M., Meier, C. A., Higgins, J. C. (2009). Clinical and biochemical abnormalities in endurance horses eliminated from competition for medical complications and requiring emergency medical treatment: 30 cases (2005–2006). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(5), 473-478.
- Finno, C. J., Valberg, S. J. (2012). A comparative review of vitamin E and associated equine disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), 1251-1266.
- Fiorellino, N. M., Lamprecht, E. D., Williams, C. A. (2009). Absorption of different oral formulations of natural vitamin E in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(2), 100-104.
- Fisher-Wellman, K., Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*, 8(1), 1.
- Flynn, M. M., Bhagavan, N. V. (1986). Lactate dehydrogenase-6: a case with acute onset and resolution. *Clinical Chemistry*, 32(3), 562-562.
- Fonseca, L. A., Gonçalves, R. C., Ribeiro Filho, J. D., Girardi, F. M., Carvalho Filho, W. P., Dias, D. C. R., Bento, L. D. (2016). Influence of selenium and vitamin E supplementation on energy metabolism in horses used in policing activity. *Comparative Clinical Pathology*, 25(2), 351-355.
- Freestone, J. F., Kamerling, S. G., Church, G., Bagwell, C., Hamra, J. (1989). Exercise induced changes in creatine kinase and aspartate aminotransferase activities in

- the horse: effects of conditioning, exercise tests and acepromazine. *Journal of Equine Veterinary Science*, 9(5), 275-280.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*, 97(3), S5-S13.
- Fridovich, I. (1976). Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. In *Iron and Copper Proteins* (pp. 530-539). Springer, Boston, MA.
- Friend, T. H. (2000). Dehydration, stress, and water consumption of horses during long-distance commercial transport. *Journal of Animal Science*, 78(10), 2568-2580.
- Frisancho, A. R. (1975). Functional adaptation to high altitude hypoxia. *Science*, 187(4174), 313-319.
- Gaber, A., Yoshimura, K., Yamamoto, T., Yabuta, Y., Takeda, T., Miyasaka, H., ... Shigeoka, S. (2006). Glutathione peroxidase-like protein of *Synechocystis* PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 128(2), 251-262.
- Gallagher, K. Stowe, H. D. (1980). Influence of exercise on serum selenium and peroxide reduction system of racing standardbred. *American Journal of Veterinary Research*, 41, 1333-1335.
- Gallagher, S. M., Castorino, J. J., Wang, D., Philp, N. J. (2007). Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Research*, 67(9), 4182-4189.
- Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J. M., Eggersdorfer, M., Frank, J., ... Özer, N. K. (2017). Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radical Biology and Medicine*, 102, 16-36.
- Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, 19(9), 1807-1819.
- Geor R. Blood builders (Hematinics). [Internet] 2000. Citado el 28 de enero de 2018. Disponible en: <https://thehorse.com/13986/blood-builders-hematinics/>.
- Giannini, E., Risso, D., Botta, F., Chiarbonello, B., Fasoli, A., Malfatti, F., ... Testa, R. (2003). Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase–alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus–related chronic liver disease. *Archives of Internal Medicine*, 163(2), 218-224.
- Gibson, J. S., Cossins, A. R., Ellory, J. C. (2000). Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells. *Journal of Experimental Biology*, 203(9), 1395-1407.

- Gliozzi, T. M., Zaniboni, L., Maldjian, A., Luzi, F., Maertens, L., Cerolini, S. (2009). Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology*, 71(6), 910-919.
- Gondim, F. J., Zoppi, C. C., dos Reis Silveira, L., Pereira-da-Silva, L., de Macedo, D. V. (2009). Possible relationship between performance and oxidative stress in endurance horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(4), 206-212.
- Gondim, F. J., Zoppi, C. C., Pereira-da-Silva, L., de Macedo, D. V. (2007). Determination of the anaerobic threshold and maximal lactate steady state speed in equines using the lactate minimum speed protocol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 146(3), 375-380.
- Gramkow, H. L., Evans, D. L. (2006). Correlation of race earnings with velocity at maximal heart rate during a field exercise test in thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 118-122.
- Greene, H. M., Cogger, E. A., Miltenberger, T. L., Koch, A. K., Bray, R. E., Wickler, S. J. (2002). Metabolic and osmoregulatory function at low and high (3800 m) altitude. *Equine Veterinary Journal*, 34(S34), 545-550.
- Gregory, J. E., Morgan, D. L., Allen, T. J., Proske, U. (2007). The shift in muscle's length-tension relation after exercise attributed to increased series compliance. *European Journal of Applied Physiology*, 99(4), 431-441.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., ... Gratas-Delamarche, A. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 89(1), 14-20.
- Gu, J., MacHugh, D. E., McGivney, B. A., Park, S. D. E., Katz, L. M., Hill, E. W. (2010). Association of sequence variants in CKM (creatine kinase, muscle) and COX4I2 (cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2) genes with racing performance in Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 569-575.
- Gupta, C., Gupta, P. H., Singh, B. (2009). Effect of Vitamin Supplementation on Exercise Induced Oxidative Stress in Trained Elite Indian Cyclists. *American Journal of Biomedical Sciences*, 1, 166-70.
- Gurd, B. J., Peters, S. J., Heigenhauser, G. J. F., LeBlanc, P. J., Doherty, T. J., Paterson, D. H., Kowalchuk, J. M. (2006). Prior heavy exercise elevates pyruvate dehydrogenase activity and speeds O₂ uptake kinetics during subsequent moderate-intensity exercise in healthy young adults. *The Journal of Physiology*, 577(3), 985-996.
- Gutteridge, J. M. C. (1975). The use of standards for malonyldialdehyde. *Analytical Biochemistry*, 69(2), 518-526.
- Haggett, E., Magdesian, K. G., Maas, J., Puschner, B., Higgins, J., Fiack, C. (2010). Whole blood selenium concentrations in endurance horses. *The Veterinary Journal*, 186(2), 192-196.

- Hall, M. M., Rajasekaran, S., Thomsen, T. W., Peterson, A. R. (2016). Lactate: friend or foe. *Physical Medicine and Rehabilitation*, 8(3), S8-S15.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5), 1147-1150.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hamanishi, T., Furuta, H., Kato, H., Doi, A., Tamai, M., Shimomura, H., ... Nanjo, K. (2004). Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 53(9), 2455-2460.
- Harris, P. A., Marlin, D. J., Gray, J. (1998). Plasma aspartate aminotransferase and creatine kinase activities in thoroughbred racehorses in relation to age, sex, exercise and training. *The Veterinary Journal*, 155(3), 295-304.
- Heck, H., Mader, A., Hess, G., Mücke, S., Müller, R., Hollmann, W. (1985). Justification of the 4-mmol/l Lactate Threshold. *International Journal of Sports Medicine*, 06(3), 117-130. DOI: 10.1055/s-2008-1025824
- Hefnawy, A. E. G., Tórtora-Pérez, J. L. (2010). The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Research*, 89(2), 185-192.
- Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., Drevet, J. R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 274(9), 2163-2180.
- Hidiroglou, N., Cave, N., Atwal, A. S., Farnworth, E. R., McDowell, L. R. (1992). Comparative vitamin E requirements and metabolism in livestock. In *Annales de Recherches Veterinaires* (Vol. 23, No. 4, pp. 337-359).
- Hillman, A. R., Vince, R. V., Taylor, L., McNaughton, L., Mitchell, N., Siegler, J. (2011). Exercise-induced dehydration with and without environmental heat stress results in increased oxidative stress. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 36(5), 698-706.
- Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., Geor, R. J. (Eds.). (2008). *Equine Exercise Physiology: The Science of Exercise in the athletic horse*. Elsevier Health Sciences.
- Ho, Y. S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., Ho, D. S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32804-32812.
- Hodgson, D. R., Davis, R. E., McConaghy, F. F. (1994). Thermoregulation in the horse in response to exercise. *British Veterinary Journal*, 150(3), 219-235.

- Hodgson, D. R., McCutcheon, L. J., Byrd, S. K., Brown, W. S., Bayly, W. M., Brengelmann, G. L., Gollnick, P. D. (1993). Dissipation of metabolic heat in the horse during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 74(3), 1161-1170.
- Hoffman, R. M., Hess, T. M., Williams, C. A., Kronfeld, D. S., Griewe-Crandell, K. M., Waldron, J. E., ... Harris, P. A. (2002). Speed associated with plasma pH, oxygen content, total protein and urea in an 80 km race. *Equine Veterinary Journal*, 34(S34), 39-43.
- Hojati, S. S., Attarzadeh Hosseini, S. R., Soltani, H., Hojati, Z. (2013). The effect of RAST anaerobic test on creatine phosphokinase and lactate dehydrogenase enzymes in active and non-active females. *Advances in Environmental Biology*, 7 (7): 1271-1274.
- Holbrook, T. C., Birks, E. K., Sleeper, M. M., Durando, M. (2006). Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 27-31.
- Horton, J. W. (2003). Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*, 189(1-2), 75-88.
- Hoshikawa, Y., Ono, S., Suzuki, S., Tanita, T., Chida, M., Song, C., ... Fujimura, S. (2001). Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 90(4), 1299-1306.
- Hsieh, Y. Y., Chang, C. C., Lin, C. S. (2006). Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *International Journal of Biological Sciences*, 2(1), 23.
- Hu, J. H., Tian, W. Q., Zhao, X. L., Zan, L. S., Wang, H., Li, Q. W., Xin, Y. P. (2010). The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal Reproduction Science*, 121(1-2), 72-77.
- Huntington, P., Crandell, K., Owens, E. (1999). Vitamin E and the performance horse. *Equine News*, 2(4), 7-8.
- Ilavazhagan, G., Bansal, A., Prasad, D., Thomas, P., Sharma, S. K., Kain, A. K., ... Selvamurthy, W. (2001). Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 72(10), 899-903.
- Inoue, Y., Osawa, T., Matsui, A., Asai, Y., Murakami, Y., Matsui, T., Yano, H. (2002). Changes of serum mineral concentrations in horses during exercise. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(4), 531-536.
- Irvine, C. H. G., Alexander, S. L. (1994). Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, 11(2), 227-238.

- Jackson M. (2000). Exercise an oxygen radical production by muscle. In *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Edited by Sen CK, Packer L, Hanninen O. Amsterdam: Elsevier Science: 57-68.
- Jackson, S. G. (1997). Trace minerals for the performance horse: known biochemical roles and estimates of requirements. *Irish Veterinary Journal*, 50(11), 668-674.
- Jagrič-Munih, S., Nemec-Svete, A., Zrimšek, P., Kramarič, P., Kos-Kadunc, V., Vovk, T., Kobal, S. (2012). Plasma malondialdehyde, biochemical and haematological parameters in standardbred horses during a selected field exercise test. *Acta Veterinaria*, 62(1), 53-65.
- Ji, L. (1995). Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(6), 1079-1086.
- Ji, L. L., Stratman, F. W., Lardy, H. A. (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle: influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 263(1), 150-160.
- Jiang, Z., Akey, J. M., Shi, J., Xiong, M., Wang, Y., Shen, Y., ... Lu, D. (2001). A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Human Genetics*, 109(1), 95-98.
- Jiménez *et al.*, 1998
- Jones, J. H., Longworth, K. E., Lindholm, A., Conley, K. E., Karas, R. H., Kayar, S. R., Taylor, C. R. (1989). Oxygen transport during exercise in large mammals. I. Adaptive variation in oxygen demand. *Journal of Applied Physiology*, 67(2), 862-870.
- Jović, S., Stevanović, J., Borozan, S., Dimitrijević, B., Milosavljević, P. (2013). Influence of physical activity of racehorses on lactate dehydrogenase and creatine kinase activities, and protein synthesis. *Acta Veterinaria*, 63(5-6), 549-568.
- Juarez, J. C., Manuia, M., Burnett, M. E., Betancourt, O., Boivin, B., Shaw, D. E., ... Doñate, F. (2008). Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H₂O₂-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(20), 7147-7152.
- Juel, C. (2008). Regulation of pH in human skeletal muscle: adaptations to physical activity. *Acta Physiologica*, 193(1), 17-24.
- Kamiya, T., Takeuchi, K., Fukudome, S., Hara, H., Adachi, T. (2018). Copper chaperone antioxidant-1, Atox-1, is involved in the induction of SOD3 in THP-1 cells. *BioMetals*, 31(1), 61-68.
- Kedzierski, W., Bergero, D., Assenza, A. (2009). Trends of hematological and biochemical values in the blood of young race horses during standardized field exercise tests. *Acta Veterinaria*, 59(5-6), 457-466.

- Keller, P., Ruedi, D., Gutzwiller, A. (1985). Tissue distribution of diagnostically useful enzymes in zoo animals: a comparative study. *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 16(1), 28-45.
- Kelly, M. P., Power, R. F. (1995). Fractionation and identification of the major selenium containing compounds in selenized yeast. *Journal Dairy Science*, 78(Suppl 1), 237.
- Kentucky Equine Research. Importance of vitamin E for horses. [Internet] 2013. Citado el 25 de enero de 2018. Disponible en: <http://www.equinews.com/article/importance-vitamin-e-horses>
- Ketchum, C. H., Robinson, C. A., Hall, L. M., Grizzle, W. E., Maclaren, N. K., Riley, W. J., Trost, C. (1984). Clinical significance and partial biochemical characterization of lactate dehydrogenase isoenzyme 6. *Clinical Chemistry*, 30(1), 46-49.
- Kienzle, E., Freismuth, A., Reusch, A. (2006). Double-Blind Placebo-Controlled Vitamin E or Selenium Supplementation of Sport Horses with Unspecified Muscle Problems. An Example of the Potential of Placebos¹, 2. *The Journal of Nutrition*, 136(7S), 2045S-2047S.
- Kim, J. S., Hinchcliff, K. W., Yamaguchi, M., Beard, L. A., Markert, C. D., Devor, S. T. (2005). Exercise training increases oxidative capacity and attenuates exercise-induced ultrastructural damage in skeletal muscle of aged horses. *Journal of Applied Physiology*, 98(1), 334-342.
- Kingston, J. K. (2008). Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training. *Hinchcliff, KW, et al.: Equine exercise physiology. Philadelphia: Saunders Elsevier*, 398-409.
- Kinnunen, S., Atalay, M., Hyypä, S., Lehmuskero, A., Hänninen, O., Oksala, N. (2005a). Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defense in endurance horse. *Journal of Sports Science and Medicine*, 4(4), 415-421.
- Kinnunen, S., Hyypä, S., Lappalainen, J., Oksala, N., Venojärvi, M., Nakao, C., ... Atalay, M. (2005b). Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *European Journal of Applied Physiology*, 93(4), 496-501.
- Kirschvink, N., de Moffarts, B., Farnir, F., Pincemail, J., Lekeux, P. (2006). Investigation of blood oxidant/antioxidant markers in healthy competition horses of different breeds. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 239-244.
- Kirschvink, N., de Moffarts, B., Lekeux, P. (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, 177(2), 178-191.
- Kirschvink, N., Fievez, L., Bougnet, V., Art, T., Degand, G., Smith, N., ... Lekeux, P. (2002). Effect of nutritional antioxidant supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. *Equine Veterinary Journal*, 34(7), 705-712.

- Knez, W. L., Jenkins, D. G., Coombes, J. S. (2007). Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(2), 283-288.
- Knight, D. A., Tyznik, W. J. (1990). The effect of dietary selenium on humoral immunocompetence of ponies. *Journal of Animal Science*, 68(5), 1311-1317.
- Koho, N. M., Hyypä, S., Pösö, A. R. (2006). Monocarboxylate transporters (MCT) as lactate carriers in equine muscle and red blood cells. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 354-358.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C., Harris, A. L., Tumor and Angiogenesis Research Group. (2005). Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma. *Neoplasia*, 7(1), 1-6.
- Krejsa, C. M., Franklin, C. C., White, C. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Kavanagh, T. J. (2010). Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), 16116-16124.
- Krumrych, W. (2010). Blood antioxidant defence in horses during physical exercises. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 54, 617-624.
- Lamprecht, E. D., Williams, C. A. (2012). Biomarkers of antioxidant status, inflammation, and cartilage metabolism are affected by acute intense exercise but not superoxide dismutase supplementation in horses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- Lang, J. K., Gohil, K., Packer, L., Burk, R. F. (1987). Selenium deficiency, endurance exercise capacity, and antioxidant status in rats. *Journal of Applied Physiology*, 63(6), 2532-2535.
- Leal, B. B., Alves, G. E., Douglas, R. H., Bringel, B., Young, R. J., Haddad, J. P. A., ... Faleiros, R. R. (2011). Cortisol circadian rhythm ratio: a simple method to detect stressed horses at higher risk of colic?. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(4), 188-190.
- Leite, T. C., Da Silva, D., Coelho, R. G., Zancan, P., Sola-Penna, M. (2007). Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochemical Journal*, 408(1), 123-130.
- Li, G., Lee, P., Mori, N., Yamamoto, I., Arai, T. (2012). Long term intensive exercise training leads to a higher plasma malate/lactate dehydrogenase (M/L) ratio and increased level of lipid mobilization in horses. *Veterinary Research Communications*, 36(2), 149-155.
- Liburt, N. R., Adams, A. A., Betancourt, A., Horohov, D. W., McKeever, K. H. (2010). Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 280-288.

- Linden, A., Art, T., Amory, H., Desmecht, D., Lekeux, P. (1991). Effect of 5 different types of exercise, transportation and ACTH administration on plasma cortisol concentration in sport horses. *Equine Exercise Physiology*, 3, 391-396.
- Lindinger, M. I. (1999). Exercise in the heat: thermoregulatory limitations to performance in humans and horses. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 24(2), 152-163.
- Lindner, A. E. (2010). Maximal lactate steady state during exercise in blood of horses. *Journal of animal science*, 88(6), 2038-2044.
- Lindner, A., Fazio, E., Ferlazzo, A. M., Medica, P., Ferlazzo, A. (2000). Plasma cortisol concentration in Thoroughbred horses during and after standardized exercise tests on a treadmill and effect of conditioning on basal cortisol values. *Pferdeheilkunde*, 16(5), 502-510.
- Lindner, A., Signorini, R., Brero, L., Arn, E., Mancini, R., Enrique, A. (2006). Effect of conditioning horses with short intervals at high speed on biochemical variables in blood. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 88-92.
- Löfstedt, J. (1997). White muscle disease of foals. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 13(1), 169-185.
- López, R., Revilla, A., Tórtora, J. La deficiencia de selenio. <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/261/articulos/deficiencia-del-selenio.html>
- Lu, Z., Nie, G., Belton, P. S., Tang, H., Zhao, B. (2006). Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International*, 48(4), 263-274.
- Lucero-Pérez M. (2008). *Eficiencia relativa de una fuente orgánica de selenio para reducir el potencial oxidativo en tejidos en músculo esquelético en cerdos*: Tesis de Maestría. UNAM.
- Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, 380(1-2), 50-58.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173(3), 502-511.
- Maiorino, M., Scapin, M., Ursini, F., Biasolo, M., Bosello, V., Flohé, L. (2003). Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34286-34290.
- Malinowski, K., Shock, E. J., Rochelle, P., Kearns, C. F., Guirnalda, P. D., McKeever, K. H. (2006). Plasma β -endorphin, cortisol and immune responses to acute exercise are altered by age and exercise training in horses. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 267-273.
- Manfredi, T. G., Fielding, R. A., O'reilly, K. P., Meredith, C. N., Lee, H. Y., Evans, W. J. (1991). Plasma creatine kinase activity and exercise-induced muscle damage in older men. *Medicine and science in sports and exercise*, 23(9), 1028-1034.

- Maral, J., Puget, K., Michelson, A. M. (1977). Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 77(4), 1525-1535.
- Marlin, D., Nankervis, K. J. (2013). *Equine Exercise Physiology*. John Wiley and Sons.
- Martin-Rosset, W. (2012). *Nutrition et Alimentation des Chevaux*. Editions Quae.
- Massanyi, P., Stawarz, R., Halo, M., Formicki, G., Lukac, N., Cupka, P., ... Kovacik, J. (2014). Blood concentration of copper, cadmium, zinc and lead in horses and its relation to hematological and biochemical parameters. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 49(8), 973-979.
- Matsuki, N., Tamura, S., Ono, K., Watari, T., Goitsuka, R., Yamanobe, A., ... Suzuki, N. (1991). Exercise-induced phospholipid degradation in the equine skeletal muscle and erythrocytes. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53(6), 1001-1007.
- Mattmiller, S. A., Carlson, B. A., Sordillo, L. M. (2013). Regulation of inflammation by selenium and selenoproteins: impact on eicosanoid biosynthesis. *Journal of Nutritional Science*, 2.
- May, J. M. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?. *The FASEB Journal*, 13(9), 995-1006.
- Maylin, G. A., Rubin, D. S., Lein, D. H. (1980). Selenium and vitamin E in horses. *The Cornell Veterinarian*, 70(3), 272-289.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- McDowell, L. R. (2002). Recent advances in minerals and vitamins on nutrition of lactating cows. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 8-19.
- McDowell, L. R., Wilkinson, N., Madison, R., Felix, T. (2007, January). Vitamins and minerals functioning as antioxidants with supplementation considerations. In *Florida Ruminant Nutrition Symposium; Best Western Gateway Grand: Gainesville, FL, USA* (pp. 30-31).
- McEwen, S. A., Hurland, T. J. (1986). Histochemical and morphometric evaluation of skeletal muscle from horses with exertional rhabdomyolysis (tying-up). *Veterinary pathology*, 23(4), 400-410.
- McGowan, C. (2008). Clinical pathology in the racing horse: the role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 24(2), 405-421.
- McGowan, C. M., Whitworth, D. J. (2008). Overtraining syndrome in horses. *Comparative Exercise Physiology*, 5(2), 57-65.

- McKeever, K. H., Hinchcliff, K. W., Reed, S. M., Robertson, J. T. (1993). Role of decreased plasma volume in hematocrit alterations during incremental treadmill exercise in horses. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 265(2), R404-R408.
- McKenzie, E. C., Esser, M. M., Payton, M. E. (2014). Serum biochemistry changes in horses racing a multiday endurance event. *Comparative Exercise Physiology*, 10(4), 215-222.
- McLeish, M. J., Kenyon, G. L. (2005). Relating structure to mechanism in creatine kinase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1), 1-20.
- Medica, P., Giacoppo, E., Fazio, E., Aveni, F., Pellizzotto, R., Ferlazzo, A. (2010). Cortisol and haematochemical variables of horses during a two day trekking event: effects of preliminary transport. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 167-170.
- Mehdi, Y., Hornick, J. L., Istasse, L., Dufrasne, I. (2013). Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 18(3), 3292-3311.
- Merezhinskaya, N., Fishbein, W. N. (2009). Monocarboxylate transporters: past, present, and future. *Histology and Histopathology*, 24(2), 243-264.
- Metz, T. O., Alderson, N. L., Chachich, M. E., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (2003). Pyridoxamine Traps Intermediates in Lipid Peroxidation Reactions in Vivo Evidence n the role of lipids in chemical modification of protein and development of diabetic complications. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42012-42019.
- Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J., Huang, G. (2013). Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology life*, 65(11), 904-910.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 235-248.
- Mikkelsen, M. E., Miltiades, A. N., Gaieski, D. F., Goyal, M., Fuchs, B. D., Shah, C. V., ... Christie, J. D. (2009). Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Critical Care Medicine*, 37(5), 1670-1677.
- Miller, B. F., Fattor, J. A., Jacobs, K. A., Horning, M. A., Navazio, F., Lindinger, M. I., Brooks, G. A. (2002). Lactate and glucose interactions during rest and exercise in men: effect of exogenous lactate infusion. *The Journal of Physiology*, 544(3), 963-975.
- Mills, P. C., Smith, N. C., Casas, I., Harris, P., Harris, R. C., Marlin, D. J. (1996). Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 74(1-2), 60-66.

- Mohammed, H. O., Divers, T. J., Summers, B. A., de Lahunta, A. (2007). Vitamin E deficiency and risk of equine motor neuron disease. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 17.
- Mohanraj, P., Merola, A. J., Wright, V. P., Clanton, T. L. (1998). Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. *Journal of Applied Physiology*, 84(6), 1960-1966.
- Moldoveanu, A. I., Shephard, R. J., Shek, P. N. (2001). The cytokine response to physical activity and training. *Sports Medicine*, 31(2), 115-144.
- Montgomery, J. B., Wichtel, J. J., Wichtel, M. G., McNiven, M. A., McClure, J. T., Markham, F., Horohov, D. W. (2012). Effects of selenium source on measures of selenium status and immune function in horses.
- Morales Almaráz, E., Domínguez Vara, I., González-Ronquillo, M., Jaramillo Escutia, G., Castelán Ortega, O., Pescador Sálas, N., Huerta Bravo, M. (2007). Diagnóstico mineral en forraje y suero sanguíneo de bovinos lecheros en dos épocas en el valle central de México. *Técnica Pecuaria en México*, 45(3).
- Moreno Escobar, F. (2013). *Determinacion de la actividad serica de creatin quinasa y asparto aminotransferasa en caballos criollos colombianos en pista de exposicion* (Doctoral dissertation).
- Moser, L. (1980). Quality of forage as affected by post-harvest storage and processing. En C. Hoveland (Ed.), *Crop quality, storage, and utilization* (págs. 227-260). Madison, WI.: ASA, CSSA.
- Moslen, M. T. (1994). Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In *Free Radicals in Diagnostic Medicine* (pp. 17-27). Springer, Boston, MA.
- Möstl, E., Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2), 67-74.
- Mruk, D. D., Silvestrini, B., Mo, M. Y., Cheng, C. Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65(4), 305-311.
- Müller, C. E., Möller, J., Jensen, S. K., Udén, P. (2007). Tocopherol and carotenoid levels in baled silage and haylage in relation to horse requirements. *Animal Feed Science and Technology*, 137(1-2), 182-197.
- Muñoz, A., Riber, C., Santisteban, R., Lucas, R. G., Castejon, F. M. (2002). Effect of training duration and exercise on blood-borne substrates, plasma lactate and enzyme concentrations in Andalusian, Anglo-Arabian and Arabian breeds. *Equine Veterinary Journal*, 34(S34), 245-251.
- Mykkänen, A. K., Pösö, A. R., McGowan, C. M., McKane, S. A. (2010). Expression of lactate transporters MCT1, MCT2 and CD147 in the red blood cells of three

- horse breeds: Finnhorse, Standardbred and Thoroughbred. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 161-166.
- Nagababu, E., Chrest, F. J., Rifkind, J. M. (2003). Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1620(1-3), 211-217.
- Nagata, S., Takeda, F., Kurosawa, M., Mima, K., Hiraga, A., Kai, M., Taya, K. (1999). Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines response to various exercises. *Equine Veterinary Journal*, 31(S30), 570-574.
- Naik, S. R. (2003). Antioxidants and their role in biological functions: An overview. *Indian Drugs*, 40(9), 501-516.
- Nathwani, R. A., Pais, S., Reynolds, T. B., Kaplowitz, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41(2), 380-382.
- National Feed Ingredients Association, Determination of alpha – tocopherol acetate in feeds with HPLC, in: NFIA Laboratory Methods Compendium. Vol. 1. National Feed Ingredients Association, West Des Moines, IA. 1991, pp. 57-59.
- National Research Council. (1989). *Nutrient requirements of horses* (Vol. 6). National Academies Press.
- National Research Council. (2006). *Mineral Tolerance of Animals: 2005*. National Academies Press.
- National Research Council. (2006). *Mineral Tolerance of Animals: 2005*. National Academies Press.
- National Research Council. (2007). National Research Council Nutrient Requirements of Horses.
- Niedźwiedz, A., Nicpoń, J., Zawadzki, M., Służewska-Niedźwiedz, M., Januszewska, L. (2012). The influence of road transport on the activities of glutathione reductase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase in equine erythrocytes. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(1), 123-126.
- Nigam, S., Schewe, T. (2000). Phospholipase A 2 s and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1), 167-181.
- Nogushi, N., Niki, E. (1999). Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: *Antioxidant status, Diet, Nutrition, and Health (edited by Papas, AM) CRC Press. Washington, DC*, 3-19.
- Nostell, K., Häggström, J. (2008). Resting concentrations of cardiac troponin I in fit horses and effect of racing. *Journal of Veterinary Cardiology*, 10(2), 105-109.
- O'Connor, C. I., Lawrence, L. M., St Lawrence, A. C., Janicki, K. M., Warren, L. K., Hayes, S. (2004). The effect of dietary fish oil supplementation on exercising horses. *Journal of Animal Science*, 82(10), 2978-2984.

- O'Brien, T. J. (2010). *The effects of supplemental vitamin E and selenium on feline immunity: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in Nutritional Science at Massey University, Palmerston North, New Zealand* (Doctoral dissertation, Massey University).
- Oldenhof, H., Friedel, K., Sieme, H., Glasmacher, B., Wolkers, W. F. (2010). Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 61(1), 115-122.
- Onmaz, A. C., Van Den Hoven, R., Gunes, V., Cinar, M., Kucuk, O. (2011). Oxidative stress in horses after a 12-hours transport period. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 162, 213-217.
- Ono, K., Inui, K., Hasegawa, T., Matsuki, N., Watanabe, H., Takagi, S., ...Tomoda, I. (1990). The changes of antioxidative enzyme activities in equine erythrocytes following exercise. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 52(4), 759-765.
- Oostenbrug, G. S., Mensink, R. P., Hardeman, M. R., De Vries, T., Brouns, F. J. P. H., Hornstra, G. (1997). Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *Journal of Applied Physiology*, 83(3), 746-752.
- Orr, J. P., Blakley, B. R. (1997). Investigation of the selenium status of aborted calves with cardiac failure and myocardial necrosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(2), 172-179.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122-3128.
- Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315-424.
- Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(2), 227-250.
- Padalino, B., Rubino, G., Centoducati, P., Petazzi, F. (2007). Training versus overtraining: evaluation of two protocols. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(1), 28-31.
- Pagan, J. (2006). Tocopherol form affects vitamin E.
- Pagan, J. D. (1998). Nutrient digestibility in horses. *Advances in Equine Nutrition*, 77-83.
- Pagan, J. D. (2000). Micromineral requirements in horses. *World Equine Veterinary*, 5, 15-21.
- Pagan, J. D., Kane, E., Nash, D. (2005). Form and source of tocopherol affects vitamin E status in Thoroughbred horses. *Pferdeheilkunde*, 21, 101-102.

- Pagan, J. D., Karnezos, P., Kennedy, M. A. P., Currier, T., Hoekstra, K. E. (1999). Effect of selenium source on selenium digestibility and retention in exercised Thoroughbreds. *Proceedings of the Equine Nutrition and Physiology Society, Raleigh, NC, USA*, 2-5.
- Pagan, J. D., Lennox, M., Perry, L., Wood, L., Martin, L. J., Whitehouse, C., Lange, J. (2010). Form of α -tocopherol affects vitamin E bioavailability in Thoroughbred horses. In *Proceedings. Nordic Feed Science Conference* (pp. 112-115).
- Panagabko, C., Morley, S., Hernandez, M., Cassolato, P., Gordon, H., Parsons, R., ... Atkinson, J. (2003). Ligand specificity in the CRAL-TRIO protein family. *Biochemistry*, 42(21), 6467-6474.
- Park, J. W., Choi, J. Y., Hong, S. A., Kim, N. Y., Do, K. T., Song, K. D., Cho, B. W. (2017). Exercise induced upregulation of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit and glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene expression in Thoroughbred horses. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 30(5), 728.
- Pasquini, A., Luchetti, E., Cardini, G. (2010). Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise. *Research in Veterinary Science*, 89(1), 120-123.
- Pazzola, M., Pira, E., Sedda, G., Vacca, G. M., Cocco, R., Sechi, S., ... Nicolussi, P. (2015). Responses of hematological parameters, beta-endorphin, cortisol, reactive oxygen metabolites, and biological antioxidant potential in horses participating in a traditional tournament. *Journal of animal science*, 93(4), 1573-1580.
- Peake, J. M., Suzuki, K., Wilson, G., Hordern, M., Nosaka, K., Mackinnon, L., Coombes, J. S. (2005). Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 37(5), 737-745.
- Pedersen, B. K., Ostrowski, K., Rohde, T., Bruunsgaard, H. (1998). The cytokine response to strenuous exercise. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76(5), 505-511.
- Pfau, T., Witte, T. H., Wilson, A. M. (2006). Centre of mass movement and mechanical energy fluctuation during gallop locomotion in the Thoroughbred racehorse. *Journal of Experimental Biology*, 209(19), 3742-3757.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2), 89-96.
- Philp, A., Macdonald, A. L., Watt, P. W. (2005). Lactate—a signal coordinating cell and systemic function. *Journal of Experimental Biology*, 208(24), 4561-4575.
- Piccione, G., Fazio, F., Giannetto, C., Assenza, A., Caola, G. (2007). Oxidative stress in thoroughbreds during official 1800-metre races. *Veterinarski Arhiv*, 77(3), 219-227.

- Piccione, G., Giannetto, C., Fazio, F., Casella, S., Caola, G. (2009). A comparison of daily rhythm of creatinine and creatine kinase in the sedentary and athlete horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(7), 575-580.
- Piccione, G., Giannetto, C., Marafioti, S., Faggio, C., Alberghina, D., Fazio, F. (2012). Training-induced modifications of circadian rhythmicity of peroxidative parameters in horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(6), 978-984.
- Piccione, G., Messina, V., Casella, S., Giannetto, C., Caola, G. (2010). Blood lactate levels during exercise in athletic horses. *Comparative Clinical Pathology*, 19(6), 535-539.
- Portier, K., de Moffarts, B., Fellman, N., Kirschvink, N., Motta, C., Letellier, C., ... Coudert, J. (2006). The effects of dietary N-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 279-284.
- Pösö, A. R. (2002). Monocarboxylate transporters and lactate metabolism in equine athletes: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(2), 63.
- Pösö, A. R., Puolanne, E. (2005). Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*, 70(3), 423-434.
- Prasad, A. S. (2014). Zinc: an antioxidant and anti-inflammatory agent: role of zinc in degenerative disorders of aging. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4), 364-371.
- Pulido, S. Y. P. (2014). Especies reactivas de oxígeno y la enzima Superóxido Dismutasa como defensa de las plantas al estrés hídrico. *RIAA*, 5(2), 269-276. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*
- Raftos, J. E., Whillier, S., Kuchel, P. W. (2010). Glutathione synthesis and turnover in the human erythrocyte alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 23557-23567.
- Rahman, I. (2005). The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD. *Treatments in Respiratory Medicine*, 4(3), 175-200.
- Raja, M. M. M., Raja, A., Imran, M. M., Santha, A. M. I., Devasena, K. (2011). Enzymes application in diagnostic prospects. *Biotechnology*, 10(1), 51-59.
- Ramírez-Bribiesca, J. E., Tórtora, J. L., Huerta, M., Aguirre, A., Hernández, L. M. (2001). Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau. *Small Ruminant Research*, 41(1), 81-85.
- Ramírez-Pérez, A. H., Buntinx, S. E., Rosiles, R. (2000). Effect of breed and age on the voluntary intake and the micromineral status of non-pregnant sheep: II. Micromineral status. *Small Ruminant Research*, 37(3), 231-242.

- Ranjithkumar, M., Kamili, N. M., Saxena, A., Dan, A., Dey, S., Raut, S. S. (2011). Disturbance of oxidant/antioxidant equilibrium in horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), 349-353.
- Räsänen, L. A., Lampinen, K. J., Pösö, A. R. (1995). Responses of blood and plasma lactate and plasma purine concentrations to maximal exercise and their relation to performance in standardbred trotters. *American Journal of Veterinary Research*, 56(12), 1651-1656.
- Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356(9225), 233-241.
- Rey, A. I., Segura, J., Arandilla, E., López-Bote, C. J. (2013). Short-and long-term effect of oral administration of micellized natural vitamin E (D- α -tocopherol) on oxidative status in race horses under intense training. *Journal of Animal Science*, 91(3), 1277-1284.
- Richardson, S. M., Siciliano, P. D., Engle, T. E., Larson, C. K., Ward, T. L. (2006). Effect of selenium supplementation and source on the selenium status of horses 1. *Journal of Animal Science*, 84(7), 1742-1748.
- Rigas, B., Sun, Y. (2008). Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. *British Journal of Cancer*, 98(7), 1157.
- Rivero, J. L. L., Ruz, A., Martí-Korff, S., Estepa, J. C., Aguilera-Tejero, E., Werkman, J., ... Lindner, A. (2007). Effects of intensity and duration of exercise on muscular responses to training of thoroughbred racehorses. *Journal of Applied Physiology*, 102(5), 1871-1882.
- Rivero, J. L., Ruz, A., Marti-Korff, S., Lindner, A. (2006). Contribution of exercise intensity and duration to training-linked myosin transitions in Thoroughbreds. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 311-315.
- Roberfroid, M. B., Calderon, P. B. (1995). *Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems*. M. Dekker. Definitions, properties and reactions of radicals. En: Roberfroid, M., Calderon P. B. (eds), Free radicals and oxidation phenomena in Biological Systems. Marcel Dekker Inc. New York. Pp 11-31 (Chapter 1)
- Robson, P. J., Alston, T. D., Myburgh, K. H. (2003). Prolonged suppression of the innate immune system in the horse following an 80 km endurance race. *Equine Veterinary Journal*, 35(2), 133-137.
- Roczniak, W., Brodziak-Dopierała, B., Cipora, E., Jakóbi-Kolon, A., Kluczka, J., Babuńska-Roczniak, M. (2017). Factors that affect the content of cadmium, nickel, copper and zinc in tissues of the knee joint. *Biological trace element research*, 178(2), 201-209.
- Romieu, I., Barraza-Villarreal, A., Escamilla-Nuñez, C., Almstrand, A. C., Diaz-Sanchez, D., Sly, P. D., Olin, A. C. (2008). Exhaled breath malondialdehyde as a marker

- of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4), 903-909.
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179(4073), 588-590.
- Sachdev, S., Davies, K. J. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 215-223.
- Saldeen, K., Saldeen, T. (2005). Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutrition Research*, 25(10), 877-889.
- Sánchez, M. (2000). Certificación de la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatinina-quinasa del material de referencia BCR 608 (tesis doctoral). *Barcelona, España: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona.*
- Sánchez-Gutiérrez, M., García-Montalvo, E. A., Izquierdo-Vega, J. A., Del Razo, L. M. (2008). Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biology and Toxicology*, 24(4), 321-329.
- Statistical Analysis System. (2004). SAS/STAT user guide, Version 9.1. 2.
- Sawhney, R. C., Malhotra, A. S., Singh, T. (1991). Glucoregulatory hormones in man at high altitude. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 62(4), 286-291.
- Schalm, O. W., Carlson, G. P. (1982). The blood and blood-forming organs [Horses].
- Scherf, H., Machlin, L. J., Frye, T. M., Krautmann, B. A., Williams, S. N. (1996). Vitamin E biopotency: Comparison of various 'natural-derived' and chemically synthesized α -tocopherols. *Animal Feed Science and Technology*, 59(1), 115-126.
- Schindhelm, R. K., Diamant, M., Dekker, J. M., Tushuizen, M. E., Teerlink, T., Heine, R. J. (2006). Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 22(6), 437-443.
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Wallimann, T. (2006). Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1762(2), 164-180.
- Schliess, F., Häussinger, D. (2002). The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. *Biological Chemistry*, 383(3-4), 577-583.
- Schmidt, M. C., Askew, E. W., Roberts, D. E., Prior, R. L., Ensign, W. Y., Hesslink, R. E. (2002). Oxidative stress in humans training in a cold, moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wilderness and Environmental Medicine*, 13(2), 94-105.

- Schneider, C. D., Barp, J., Ribeiro, J. L., Belló-Klein, A., Oliveira, A. R. (2005). Oxidative stress after three different intensities of running. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 30(6), 723-734.
- Schott 2nd, H. C., McGlade, K. S., Molander, H. A., Leroux, A. J., Hines, M. T. (1997). Body weight, fluid, electrolyte, and hormonal changes in horses competing in 50-and 100-mile endurance rides. *American Journal of Veterinary Research*, 58(3), 303-309.
- Seljeskog, E., Hervig, T., Mansoor, M. A. (2006). A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clinical Biochemistry*, 39(9), 947-954.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1), 91-100.
- Sharif, R., Thomas, P., Zalewski, P., Fenech, M. (2015). Zinc supplementation influences genomic stability biomarkers, antioxidant activity, and zinc transporter genes in an elderly Australian population with low zinc status. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(6), 1200-1212.
- Siciliano, P. D., Parker, A. L., Lawrence, L. M. (1997). Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. *Journal of Animal Science*, 75(6), 1553-1560.
- Siciliano, P. D., Wood, C. H. (1993). The effect of added dietary soybean oil on vitamin E status of the horse. *Journal of Animal Science*, 71(12), 3399-3402.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S31-S38.
- Sies, H. (1997). Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental Physiology*, 82, 291-295.
- Sies, H., Murphy, M. E. (1991). Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 8(2), 211.
- Sikka, S. C. (2004). Andrology lab corner: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, 25(1), 5-18.
- SIMAT, GDF 2013. Sistema de monitoreo atmosférico [Internet] Citado el 17 noviembre de 2014. Disponible en:
<http://www.aire.df.gob.mx/default.php?opc=%27aKBj%27>
- Simmonds, N., Becker, J. E., McCollum, E. V. (1927). The relation of vitamin E to iron assimilation. *Journal of the American Medical Association*, 88(14), 1047-1050.

- Sjödin, B., Jacobs, I. (1981). Onset of blood lactate accumulation and marathon running performance. *International Journal of Sports Medicine*, 2(01), 23-26.
- Sjödin, B., Westing, Y. H., Apple, F. S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Medicine*, 10(4), 236-254.
- Skripnichenko, G. G., Ponomareva, T. A., Makarov, S. N. (1980). Level of the trace elements Fe, Cu and Zn in the blood serum of Arab horses in relation to genotype at the Tf, Cp and Es loci. *Sbornik Nauchnykh Trudov. Moskovskaya Veterinarnaya Akademiya*, (115), 84-85.
- Smarsh, D. N., Williams, C. A. (2017). Oxidative Stress and Antioxidant Status in Standardbreds: Effect of Age and Training in Resting Plasma and Muscle. *Journal of Equine Veterinary Science*, 48, 93-102.
- Smith, J. D., Jordan, R. M., Nelson, M. L. (1975). Tolerance of ponies to high levels of dietary copper. *Journal of animal science*, 41(6), 1645-1649.
- Smith, P., Stublely, D., Blackmore, D. J. (1983). Measurement of superoxide dismutase, diamine oxidase and caeruloplasmin oxidase in the blood of thoroughbreds. *Research in Veterinary Science*, 35(2), 160-164.
- Smith, P., Stublely, D., Blackmore, D. J. (1983). Measurement of superoxide dismutase, diamine oxidase and caeruloplasmin oxidase in the blood of thoroughbreds. *Research in Veterinary Science*, 35(2), 160-164.
- Snow, D. H., Rose, R. J. (1981). Hormonal changes associated with long distance exercise. *Equine Veterinary Journal*, 13(3), 195-197.
- Soares, J. C. M., Zanella, R., Bondan, C., Alves, L. P., de Lima, M. R., da Motta, A. C., Zanella, E. L. (2011). Biochemical and antioxidant changes in plasma, serum, and erythrocytes of horses before and after a jumping competition. *Journal of equine veterinary science*, 31(7), 357-360.
- Soares, O. A. B., D'Angelis, F. H. D. F., Feringer Júnior, W. H., Nardi, K. B., Trigo, P., Almeida, F. Q. D., ... Ferraz, G. D. C. (2013). Serum activity of creatine kinase and aminotransferase aspartate enzymes of horses submitted to muscle biopsy and incremental jump test. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 14(2), 299-307.
- Soffler, C. (2007). Oxidative stress. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 23(1), 135-157.
- Stabel, J. R., Spears, J. W., Brown Jr, T. T., Brake, J. (1989). Selenium effects on glutathione peroxidase and the immune response of stressed calves challenged with *Pasteurella hemolytica*. *Journal of Animal Science*, 67(2), 557-564.
- Stadtman, E. R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, 11(9), 1105-1112.
- Steinbrenner, H., Speckmann, B., Klotz, L. O. (2016). Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 113-119.

- Stowe, H. D., Herdt, T. H. (1992). Clinical assessment of selenium status of livestock. *Journal of Animal Science*, 70(12), 3928-3933.
- Streltsova, J. M., McKeever, K. H., Liburt, N. R., Gordon, M. E., Manso Filho, H., Horohov, D. W., ... Franke, W. (2006). Effect of orange peel and black tea extracts on markers of performance and cytokine markers of inflammation in horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 3(3), 121-130.
- Suttle, N. F. (2010). *Mineral nutrition of livestock*. CABI.
- Szlyk, P. C., Sils, I. V., Francesconi, R. P., Hubbard, R. W., Armstrong, L. E. (1989). Effects of water temperature and flavoring on voluntary dehydration in men. *Physiology and behavior*, 45(3), 639-647.
- Tadich, T. A., Araya, O., Solar, F., Ansoleaga, N., Nicol, C. J. (2013). Description of the responses of some blood constituents to rodeo exercise in Chilean Creole horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(3), 174-181.
- Teixeira, V. H., Valente, H. F., Casal, S. I., Marques, A. F., Moreira, P. A. (2009). Antioxidants do not prevent postexercise peroxidation and may delay muscle recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 41(9), 1752-60.
- Teixeira-Neto, A. R., Ferraz, G. D. C., Moscardini, A. R. C., Balsamão, G. M., Souza, J. C. F., Queiroz-Neto, A. D. (2008). Alterations in muscular enzymes of horses competing long-distance endurance rides under tropical climate. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(3), 543-549.
- The horse. Blood builders (hematinics). [Internet] 2000. Citado el 19 de diciembre 2017. Disponible en: <https://thehorse.com/13986/blood-builders-hematinics/>
- Thomas, D. P., Fregin, G. F. (1981). Cardiorespiratory and metabolic responses to treadmill exercise in the horse. *Journal of Applied Physiology*, 50(4), 864-868.
- Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., Tosatto, S. C. (2008). Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(9), 1501-1514.
- Torquato, P., Ripa, O., Giusepponi, D., Galarini, R., Bartolini, D., Wallert, M., ... Mazzini, F. (2016). Analytical strategies to assess the functional metabolome of vitamin E. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 124, 399-412.
- Torres, S. H., de Oca, M. M., Loeb, E., Zabner-Oziel, P., Wallis, V., Hernández, N. (2009). Lactate dehydrogenase isozymes in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, 45(2), 75-80.
- Traber, M. G. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, 27, 347-362.
- Tun-Abraham, M. E., Martínez-Ordaz, J. L., Romero-Hernandez, T. (2014). Hepatic artery pseudoaneurysm: report of two cases. *Cirugia y cirujanos*, 82(6), 674-679.

- Urso, M. L., Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41-54.
- USDA, Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 (2010). [Internet] 2016 (Citado el 11 de mayo 2018) disponible en (<https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/oxygen-radical-absorbance-capacity-orac-of-selected-foods-release-2-2010/>)
- Väihkönen, L. K., Heinonen, O. J., Hyypä, S., Nieminen, M., Pösö, A. R. (2001). Lactate-transport activity in RBCs of trained and untrained individuals from four racing species. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(1), R19-R24.
- Valberg, S., Jönsson, L., Lindholm, A., Holmgren, N. (1993). Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Veterinary Journal*, 25(1), 11-16.
- Valentine, B. (2005). Diagnosis and treatment of equine polysaccharide storage myopathy. *Journal of Equine Veterinary Science*, 25(2), 52-61.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Van den Ende, W., Peshev, D., De Gara, L. (2011). Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science and Technology*, 22(12), 689-697.
- Van der Meulen, J. H., Kuipers, H., Drukker, J. (1991). Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. *Journal of Applied Physiology*, 71(3), 999-1004.
- Van Erck, E., Votion, D. M., Serteyn, D., Art, T. (2007). Evaluation of oxygen consumption during field exercise tests in Standardbred trotters. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 4(1), 43-49.
- Vargas Mendoza, N. (2012). Efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y los principios activos de *Geranium shiedeanum*. UAEH. Instituto de Ciencias de la Salud.
- Veera, K. R., Charles, T. K., Prasad, M., Reddanna, P. (1992). Exercise-induced oxidant stress in the lung tissue: role of dietary supplementation of vitamin E and selenium. *Biochemistry International*, 26(5), 863-871.
- Velázquez-Cantón, E., de la Cruz-Rodríguez, N., Zarco, L., Rodríguez, A., Ángeles-Hernández, J. C., Ramírez-Orejuel, J. C., Ramírez-Pérez, A. H. (2018). Effect of selenium and vitamin e supplementation on lactate, cortisol, and malondialdehyde in horses undergoing moderate exercise in a polluted environment. *Journal of Equine and Veterinary Science*. En prensa.

- Vincent, T. L., Newton, J. R., Deaton, C. M., Franklin, S. H., Biddick, T., McKeever, K. H., ... Marlin, D. J. (2006). Retrospective study of predictive variables for maximal heart rate (HRmax) in horses undergoing strenuous treadmill exercise. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 146-152.
- Vinña, J., Gomez-Cabrera, M. C., Lloret, A., Marquez, R., Minana, J. B., Pallardó, F. V., Sastre, J. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology life*, 50(4-5), 271-277.
- Vladimirov, I. (1998). Free radicals and antioxidants. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, (7), 43-51.
- Volfinger, L., Lassourd, V., Michaux, J. M., Braun, J. P., Toutain, P. L. (1994). Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 266(2), R434-R441.
- Wagner, E. L., Potter, G. D., Gibbs, P. G., Eller, E. M., Scott, B. D., Vogelsang, M. M., Walzem, R. L. (2011). Copper and zinc balance in exercising horses fed 2 forms of mineral supplements. *Journal of Animal Science*, 89(3), 722-728.
- Wagner, E. L., Potter, G. D., Gibbs, P. G., Eller, E. M., Scott, B. D., Vogelsang, M. M., Walzem, R. L. (2010). Copper, zinc-superoxide dismutase activity in exercising horses fed two forms of trace mineral supplements. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(1), 31-37.
- Wagner, P. D. (2000). Reduced maximal cardiac output at altitude—mechanisms and significance. *Respiration Physiology*, 120(1), 1-11.
- Wataya, T., Nunomura, A., Smith, M. A., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Shimohama, S., ... Cleveland, D. W. (2002). High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4644-4648.
- Watson, T. A., Callister, R., Taylor, R. D., Sibbritt, D. W., MacDonald-Wicks, L. K., Garg, M. L. (2005). Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 37(1), 63-71.
- Weiser, H., Riss, G., Kormann, A. W. (1992). Selective Biodiscrimination of α -Tocopherol Stereoisomers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669(1), 393-395.
- Weiss, W. P. (2005, May). Selenium sources for dairy cattle. En *Tri-State Dairy Conference, Allen County War Memorial Coliseum, Ft. Wayne, IN. USA, May* (pp. 2-3).
- Wernicki, A., Urban-Chmiel, R., Kankofer, M., Mikucki, P., Puchalski, A., Tokarzewski, S. (2006). Evaluation of plasma cortisol and TBARS levels in calves after short-term transportation. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 157(1), 30-34.

- White, A., Estrada, M., Walker, K., Wisnia, P., Filgueira, G., Valdés, F., ... Martínez, R. (2001). Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 128(1), 99-104.
- White, S. H., Johnson, S. E., Bobel, J. M., Warren, L. K. (2016). Dietary selenium and prolonged exercise alter gene expression and activity of antioxidant enzymes in equine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 94(7), 2867-2878.
- White, S. H., Warren, L. K. (2017). Submaximal exercise training, more than dietary selenium supplementation, improves antioxidant status and ameliorates exercise-induced oxidative damage to skeletal muscle in young equine athletes. *Journal of Animal Science*, 95(2), 657-670.
- Wichert, B., Frank, T., Kienzle, E. (2002). Zinc, copper and selenium intake and status of horses in Bavaria. *The Journal of Nutrition*, 132(6), 1776S-1777S.
- Wichtel, J. J., Grace, N. D., Firth, E. C. (1997). Selenium in the horse: New developments. *Newsletter of New Zealand Veterinary Association*.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295.
- Williams, C. A. (2010). Antioxidant supplementation to the exercising horse. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 145-150.
- Williams, C. A., Burk, A. O. (2012). Antioxidant status in elite three-day event horses during competition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.
- Williams, C. A., Carlucci, S. A. (2006). Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 617-621.
- Williams, C. A., Gordon, M. E., Betros, C. L., McKeever, K. H. (2008). Apoptosis and antioxidant status are influenced by age and exercise training in horses 1. *Journal of Animal Science*, 86(3), 576.
- Williams, C. A., Kronfeld, D. S., Hess, T. M., Saker, K. E., Waldron, J. N., Crandell, K. M., ... Harris, P. A. (2004). Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race 1. *Journal of Animal Science*, 82(2), 588-594.
- Williams, C. A., Kronfeld, D. S., Hess, T. M., Saker, K. E., Waldron, J. E., Crandell, K. M., Harris, P. A. (2005). Comparison of oxidative stress and antioxidant status in endurance horses in three 80-km races. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 2(3), 153-157.
- Wilson, T. M., Morrison, H. A., Palmer, N. C., Finley, G. G. (1976). Myodegeneration and suspected selenium/vitamin E deficiency in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169(2), 213-217.

- Wiseman, S., Thomas, J. K., McPhee, L., Hursky, O., Raine, J. C., Pietrock, M., ... Janz, D. M. (2011). Attenuation of the cortisol response to stress in female rainbow trout chronically exposed to dietary selenomethionine. *Aquatic toxicology*, 105(3-4), 643-651.
- Wróbel, A., Gomułkiewicz, J. (1999). Electron paramagnetic resonance studies of membrane fluidity in ozone-treated erythrocytes and liposomes. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 47(1), 99-105.
- Wyse, C., Cathcart, A., Sutherland, R., Ward, S., McMillan, L., Gibson, G., ...Skeldon, K. (2005). Effect of maximal dynamic exercise on exhaled ethane and carbon monoxide levels in human, equine, and canine athletes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 141(2), 239-246.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L. (2006). Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany*, 56(3), 274-285.
- Yang, T., Poovaiah, B. W. (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 4097-4102.
- Yeum, K. J., Russell, R. M., Krinsky, N. I., Aldini, G. (2004). Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 97-103.
- Yoshikawa, T., Furukawa, Y., Wakamatsu, Y., Takemura, S., Tanaka, H., Kondo, M. (1982). Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats. *Biochemical Medicine*, 27(2), 207-213.
- Young, I. S., Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186.
- Youssef, M. A., El-Khodery, S. A., Ibrahim, H. M. M. (2012). Antioxidant trace elements in serum of draft horses with acute and chronic lower airway disease. *Biological Trace Element Research*, 150(1-3), 123-129.
- Youssef, M. A., El-khodery, S. A., Ibrahim, H. M. M. (2013). Effect of selenium and vitamin C on clinical outcomes, trace element status, and antioxidant enzyme activity in horses with acute and chronic lower airway disease. A randomized clinical trial. *Biological Trace Element Research*, 152(3), 333-342.
- Yur, F., Dede, S., Deger, Y., Kilicalp, D. (2008). Effects of vitamin E and selenium on serum trace and major elements in horses. *Biological Trace Element Research*, 125(3), 223-228.
- Zhao, J., Lorenzo, S., An, N., Feng, W., Lai, L., Cui, S. (2013). Effects of heat and different humidity levels on aerobic and anaerobic exercise performance in athletes. *Journal of Exercise Science and Fitness*, 11(1), 35-41.

- Zidenberg-Cherr, S., Keen, C. L., Lönnerdal, B., Hurley, L. S. (1983). Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the rat: developmental correlations affected by manganese deficiency. *The Journal of Nutrition*, 113(12), 2498-2504.
- Zingg, J. M. (2007). Vitamin E: an overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5-6), 400-422.

8 ANEXOS

I LACTATO

EFFECTO DE LA ACUMULACIÓN DEL LACTATO EN EL METABOLISMO MUSCULAR

La acumulación de LAC en las células conlleva a la fatiga muscular (Cairns, 2006); además de elevar sus concentraciones sanguíneas; se han observado incrementos en el LAC muscular desde 100 a más de 200 mmol/kg de peso seco (Rivero *et al.*, 2006; Rivero *et al.*, 2007; Piccione *et al.*, 2010). La concentración de ácido láctico incrementa la presión osmótica de los miocitos con la subsecuente entrada de líquido extracelular al sarcoplasma, aumentando el volumen celular. Dada la fuerte acidez del ácido láctico, se disocia rápidamente en pH fisiológico, tiene un pKa de 3.86, el LAC y los protones contribuyen a la acidificación, misma que perjudica la bomba y los canales de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico, lo que incrementa el tiempo de relajación de las sarcómeras. Los protones afectan también la conformación de la ATP-asa, necesaria para la contracción. Los protones inhiben la actividad de la enzima glucolítica fosfofructocinasa-1, y la fosforilación del glucógeno por lo tanto, la producción de energía disminuye y el músculo es menos eficiente (Pösö, 2002). El pH del miocito se mantiene por los sistemas buffers que incluyen las proteínas, fosfatos, carnosina y el bicarbonato; este último es el más eficiente ellos. El contenido de proteína en el músculo es importante (la carne de caballo contiene alrededor de 20 g/100 g), y funciona como buffer. Las concentraciones de carnosina en el músculo equino y humano es alta, y es mayor en fibras tipo IIB (Artioli *et al.*, 2010; Derave *et al.*, 2007). La capacidad buffer en el músculo del caballo puede ser 50 % veces mayor que la de un atleta humano, pero ni aún así evita la acidificación. En los caballos, posterior a un ejercicio máximo, el pH muscular fluctúa entre 6.4 y 6.5; en los humanos se han llegado a reportar fluctuaciones entre un 6.2 a un 6.9 (Pösö, 2002). La acumulación de H^+ contribuye a una reducción en el tiempo de resistencia para el ejercicio, afectando directamente la condición, la actividad enzimática, la regulación de iones y las proteínas (Edge *et al.*, 2006).

El ácido láctico abandonará el miocito, aunque, los fosfolípidos de las membranas biológicas evitan el paso de H^+ y del LAC. Sin embargo, el papel de la difusión no iónica es mayor que la del lactato, aumenta cuando las concentraciones de ácido láctico son mayores y cuando el pH disminuye. Los protones liberados en la disociación del ácido láctico, pueden ser transportados a través de un sistema Na^+/H^+ ; o por los MCT mismos que son más importante en el caso de las fibras musculares de humanos (Pösö, 2002). De las 14 proteínas que conforman a los MCT, MCT-1 y MCT-4 necesitan de una proteína secundaria (ancilaria) CD147, para la translocación de los MCT a la membrana plasmática y formar un complejo transporte activo (Gallagher *et al.*, 2007). La mayor isoforma de MCT es MCT1, la cual se expresa en la mayoría de los tejidos. En las fibras musculares tipo I predomina la isoforma MCT-1, cuya expresión es regulada por el entrenamiento, o mismo que las mitocondrias. Así, el MCT4 que es abundante en las fibras Tipo II aumenta conforme el entrenamiento (Pösö, 2002). Los MCT son activados cuando el pH se encuentra bajo, otro importante regulador, es el gradiente de iones en el sarcolema, tan pronto como las concentraciones de LAC que se encuentran dentro del espacio extracelular, se acercan al músculo, el flujo del LAC es atenuado (Pösö, 2002).

En los eritrocitos equinos, el MCT-1, así como la proteína CD147 están expresadas (Koho *et al.*, 2006). Durante la fase del ejercicio, el LAC eliminado por el músculo es captado del plasma por los eritrocitos, llegando a contener hasta 50 % del LAC sanguíneo (Mykkänen, *et al* 2010) y el 60 % del líquido sanguíneo (Lindner, 2010); este flujo mantiene el gradiente entre las fibras musculares y el plasma. Así, los eritrocitos del caballo actúan como “soporte” del transporte de LAC, tienen la capacidad de acarrearlo en relación con la cantidad de MCT-1 y CD147. Los niveles de LAC en sangre llegan a aumentar 1 mmol de LAC/L durante los primeros 10 min del ejercicio (Lindner, 2010). El caballo también posee los MCT-2 en la membrana celular de los hematíes (Mykkänen, *et al* 2010). Los caballos son al parecer únicos en presentar un transporte bimodal de lactato, 30 % presenta un bajo nivel de transporte y 70 % un alto nivel (Väihkönen *et al.*, 2001). Un individuo con gran capacidad de transportar LAC, puede producir mayor cantidad de ATP desde el glucógeno/glucosa antes de que el pH interno alcance el punto

crítico; a diferencia de un individuo con baja capacidad de transporte. Esto es soportado por dos hechos: el primero, es que muchos de los atletas de élite, tienen gran actividad de MCT y el segundo es que aquellos seres humanos con deficiencia en MCT, padecen intolerancia al ejercicio (Pösö, 2002). Räsänen *et al.* (1995) demostraron que, los caballos con mayor capacidad de transporte de LAC hacia los eritrocitos tienen un mejor desempeño. En tanto Mykkänen *et al.* (2010) concluyen que los caballos de raza Standardbred tienen una característica recesiva autosómica, por lo que su transporte de LAC es de bajo.

Tanto el ácido láctico como su forma ionizada son solubles en agua distribuyéndose por todo el organismo. Desde el plasma, el LAC es transportado a los eritrocitos, hepatocitos, corazón, miocitos y otros tejidos (Pösö, 2002).

METABOLISMO DEL LACTATO: EJERCICIO Y RECUPERACIÓN

El transporte del lactato hacia el eritrocito favorece el mantenimiento del gradiente de concentración del músculo – plasma. Uno de los destinos del LAC es el hígado que lo utilizará de forma diferente. Como ya se mencionó, el músculo puede oxidar y obtener energía a partir del LAC, mismo que retiene hasta el 90 % de energía de la glucosa; mientras que en el hígado, especialmente durante el ejercicio, el LAC es utilizado como sustrato gluconeogénico, para reincorporarse como glucosa a la circulación para ser utilizado para el trabajo muscular, cardíaco, de músculos no contráctiles y cerebral (Brooks *et al.*, 2002). Durante la recuperación, el tejido muscular que representa el tejido más abundante del organismo (40 % PV), cambia de productor a consumidor de LAC, debido a que éste es un buen sustrato energético, altamente disponible; además, es utilizado como sustrato para la síntesis de glucógeno. En caballos y en humanos, en la recuperación del ejercicio ligero hay un incremento en la desaparición del LAC sanguíneo, ya que el consumo muscular de energía puede ser el doble que durante el descanso; pero es menor en comparación con el del máximo ejercicio anaeróbico, que

incrementa 20 veces respecto al del músculo en descanso (Pösö, 2002). El exceso de LAC que no alcanza a metabolizarse por el organismo es eliminado vía renal.

II CUADROS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cuadro 8.1 Análisis estadístico para el peso vivo de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20	0.10	0.7535
Vitamina E (E)	1	20	0.12	0.7326
Se \times E	1	20	1.67	0.2109
Tiempo (t)	10	168	4.30	<0.0001
Se \times t	10	168	0.89	0.5470
E \times t	10	168	0.65	0.7676
Se \times E \times t	11	168	1.15	0.3296

Cuadro 8.2 Análisis estadístico para la concentración de cortisol en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20	5.99	0.0237
Vitamina E (E)	1	20	1.75	0.2007
Se \times E	1	20	2.43	0.1351
Tiempo (t)	11	186	5.97	<0.0001
Se \times t	11	186	1.06	0.3937
E \times t	11	186	1.22	0.2738
Se \times E \times t	11	186	0.66	0.7765

Cuadro 8.3 Análisis estadístico para la concentración de malondialdehído (MDA) en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	19.9	0.14	0.7156
Vitamina E (E)	1	19.9	0.59	0.4500
Se \times E	1	19.9	0.01	0.9278
Tiempo (t)	11	188.0	34.53	<0.0001
Se \times t	11	188.0	0.39	0.9581
E \times t	11	188.0	0.73	0.7121
Se \times E \times t	11	188.0	1.61	0.9935

Cuadro 8.4 Análisis estadístico para la concentración sanguínea de selenio en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20	8.27	0.0093
Vitamina E (E)	1	20	1.05	0.3167
Se \times E	1	20	2.60	0.1228
Tiempo (t)	11	188	40.96	<0.0001
Se \times t	11	188	0.83	0.6056
E \times t	11	188	0.78	0.6599
Se \times E \times t	11	188	0.49	0.9097

Cuadro 8.5 Análisis estadístico para la concentración de alfa tocoferol en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Valor basal	1	183	1217.13	<0.0001
Selenio (Se)	2	183	7.27	0.0009
Vitamina E (E)	1	183	0.11	0.7351
Se \times E	1	183	2.34	0.1280
Tiempo (t)	1	183	5.21	0.0236
Se \times t	1	183	1.88	0.1726
E \times t	1	183	1.40	0.2379
Se \times E \times t	1	183	0.57	0.4504

Cuadro 8.6 Análisis estadístico para la actividad enzimática de creatina quinasa (CK) en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20	1.23	0.2805
Vitamina E (E)	1	20	0.19	0.6654
Se \times E	1	20	0.27	0.6095
Tiempo (t)	11	188	6.61	<0.0001
Se \times t	11	188	1.49	0.1386
E \times t	11	188	0.81	0.6295
Se \times E \times t	11	188	1.61	0.0986

Cuadro 8.7 Análisis estadístico para la actividad enzimática de aspartato amino transferasa (AST) en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20	3.33	0.0829
Vitamina E (E)	1	20	0.31	0.5838
Se \times E	1	20	0.25	0.6205
Tiempo (t)	11	187	15.75	<0.0001
Se \times t	11	187	0.84	0.5967
E \times t	11	187	1.20	0.2883
Se \times E \times t	11	187	0.65	0.7866

Cuadro 8.8 Análisis estadístico para la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero de caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos de niveles DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20	0.03	0.8676
Vitamina E (E)	1	20	3.95	0.0607
Se \times E	1	20	0.04	0.8474
Tiempo (t)	11	220	26.21	<0.0001
Se \times T	11	220	0.79	0.6460
E \times t	11	220	1.66	0.0843
Se \times E \times t	11	220	0.33	0.9788

Cuadro 8.9 Análisis estadístico para la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20.1	1.36	0.2570
Vitamina E (E)	1	20.1	0.67	0.4215
Se \times E	1	20.1	0.01	0.9441
Tiempo (t)	11	189.0	7.33	<0.0001
Se \times t	11	189.0	0.75	0.6916
E \times t	11	189.0	0.86	0.5785
Se \times E \times t	11	189.0	1.03	0.4226

Cuadro 8.10 Análisis estadístico para la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) eritrocitaria en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20	4.40	0.0488
Vitamina E (E)	1	20	0.32	0.5788
Se \times E	1	20	1.27	0.2726
Tiempo (t)	10	187	86.27	<0.0001
Se \times t	10	187	1.22	0.2743
E \times t	10	187	1.82	0.0536
Se \times E \times t	10	187	2.88	0.0016

Cuadro 8.11 Análisis estadístico para la concentración sanguínea de zinc en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	20.1	0.01	0.9324
Vitamina E (E)	1	20.1	0.00	0.9714
Se \times E	1	20.1	3.06	0.0955
Tiempo (t)	11	186.0	74.71	<0.0001
Se \times t	11	186.0	0.84	0.6016
E \times t	11	186.0	0.70	0.7338
Se \times E \times t	11	186.0	1.18	0.3004

Cuadro 8.12 Análisis estadístico para la concentración sanguínea de cobre en caballos suplementados con dos niveles de selenio (0.1 y 0.3 mg Se/kg MS) y dos niveles de DL- α -tocoferol (1.6 y 2.0 UI vitamina E/kg PV), sometidos a ejercicio moderado.

Efecto	GL Numerador	GL Denominador	Valor de F	Valor de P
Selenio (Se)	1	19.8	0.78	0.3870
Vitamina E (E)	1	19.8	0.00	0.9956
Se \times E	1	19.8	0.00	0.9748
Tiempo (t)	11	180.0	60.93	<0.0001
Se \times t	11	180.0	0.20	0.9976
E \times t	11	180.0	0.76	0.6824
Se \times E \times t	11	180.0	1.35	0.2005